

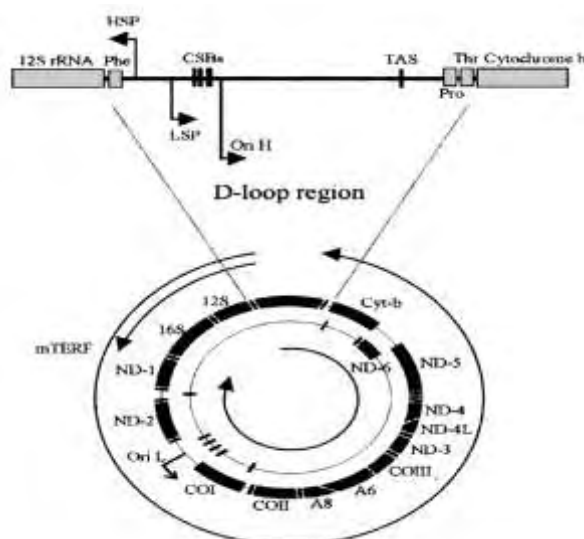
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας:
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:

Ανάλυση της περιοχής D-loop του μιτοχονδριακού DNA μεταξύ διαφορετικών
φυλών προβάτων

Μαργαριτοπούλου Βασιλική



Λάρισα, 2013

Ανάλυση της περιοχής D-loop του μιτοχονδριακού DNA μεταξύ διαφορετικών φυλών προβάτων

Analysis of the mitochondrial DNA D-loop region between different sheep breeds

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

(ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ): Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ:

Λέκτορας Μοριακής Βιολογίας Ζωικών Οργανισμών

ΜΠΙΛΛΙΝΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ:

Καθηγητής Ιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων και
Πρόεδρος της Κτηνιατρικής Σχολής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και κυριώς για την καθοδήγηση και τις διορθώσεις όσον αφορά το περιεχόμενο της εργασίας αυτής. Ευχαριστώ επίσης την Λέκτορα Μοριακής Βιολογίας Ζωικών Οργανισμών, κα. Σαραφίδου Θεολογία, καθώς και τον Καθηγητή Ιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Χαράλαμπο Μπιλλίνη, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωσταντίνο για την πολύτιμη βοήθεια, τη συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την πολύτιμη βοήθεια του και την υποστήριξη του, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε.

Λάρισα, Ιούλιος 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Οι ορισμοί του είδους	3
1.2 Η ειδογένεση, τα στάδια και οι μηχανισμοί της	4
1.3 Μοριακοί δείκτες	8
1.4 Η γονιδιωματική εξέλιξη και τα φυλογενετικά δέντρα	11
1.5 Μιτοχόνδρια	12
1.6 Τα μιτοχόνδρια ως μοριακός δείκτης	16
1.7 OXPHOS και συνεξέλιξη μιτοχονδριακού-πυρηνικού DNA	20
1.8 Το είδος <i>Ovis aries</i>	22
2. ΣΚΟΠΟΣ	24
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
3.1 Δειγματοληψία	25
3.2 Απομονώσεις γενετικού υλικού	27
3.2.1 Απομονώση ολικού DNA με SSC Buffer	27
3.2.2 Απομόνωση ολικού DNA μέσω kit με στήλες διοξειδίου του πυριτίου	29
3.3 Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA	31
3.3.1 Ηλεκτροφόρηση	33
3.3.2 Φωτομέτρηση	33
3.4 Πολλαπλασιασμός γονιδιακών τμημάτων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)	35
3.5 Ανάλυση πολυμρφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism)	38
3.6 Καθαρισμός προϊόντων PCR	43
3.7 Αλληλούχιση προϊόντων PCR	44
3.8 Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (MSA – Multiple Sequence Alignment) και δημιουργία φυλογενετικού δέντρου	44

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
4.1 Απομονώσεις	46
4.2 Εκτίμηση επιτυχίας αντίδρασης PCR	46
4.3 Ανάλυση μέσω πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP)	47
4.4 Αλληλούχιση, διορθώσεις και στοίχιση	48
4.5 Φυλογενετική ανάλυση και δημιουργία φυλογενετικού δέντρου	50
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κύριος στόχος της εργασίας είναι η εύρεση στοιχείων που θα υποστηρίξουν τη θεωρία σχετικά με τη συμβολή των μιτοχονδρίων –μέσω της βιοενεργητικής τους- σε γεγονότα δημιουργίας ξεχωριστών φυλών, μελετώντας φυλές προβάτων (*Ovis aries*). Βασίζεται στο συνδυασμό στοιχείων προηγούμενων ερευνών σχετικά με τη γενετική των προβάτων, τη γενετική πληθυσμών, τις φυλογενετικές μελέτες και τη φυλογεωγραφία τους, με νέα στοιχεία λειτουργικής γονιδιωματικής, βιοπληροφορικής και *in silico* αναλύσεων. Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια μονάδα παραγωγής της κυτταρικής ενέργειας διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου, στον κυτταρικό θάνατο, τη διαφοροποίηση των ιστών με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις ακόμη και στην ανάπτυξη ολόκληρων οργανισμών. Δεδομένου του ρόλου τους ως ζωτικής σημασίας οργανίδια για την επιβίωση των κυττάρων και κατά συνέπεια των οργανισμών, τα λειτουργικά τους στοιχεία υφίστανται συνεχώς -θετική και αρνητική- επιλογή. Η λειτουργία των μιτοχονδρίων βρίσκεται υπό τον διπλό έλεγχο του μιτοχονδριακού και του πυρηνικού γονιδιώματος. Η αυτόνομη αντιγραφή του mtDNA, ο μη επαρκής μηχανισμός επιδιόρθωσης και η γειννιάσή του με μέρη όπου η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι έντονη, δρουν συνεργιστικά προκαλώντας στο mtDNA αυξημένο ρυθμό μεταλλάξεων -δεκαπλάσιο του πυρηνικού- καθιστώντας αναγκαία τη συνεξέλιξη γονιδίων που κωδικοποιούν για κοινές λειτουργίες των δύο γονιδιωμάτων. Η βασική ιδέα της εργασίας, είναι ο έλεγχος τυχόν γενετικών διαφορών των 13 γονιδίων του mtDNA που σχετίζονται με το μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) σε 14 φυλές προβάτων, με σκοπό την εύρεση του ρόλου που έχει η μιτοχονδριακή βιοενεργητική στη δημιουργία ξεχωριστών φυλών. Σαν πρώτο βήμα προσπαθήσαμε να βρούμε διαφοροποιήσεις μεταξύ των φυλών στην εξελικτικά ουδέτερη περιοχή του mtDNA τη D-loop, χρησιμοποιώντας 91 άτομα. Όπως ήταν αναμενόμενο μετά από PCR ενίσχυση και αλληλούχηση, η διαφοροποίηση που βρέθηκε ήταν μη σημαντική. Η ανάλυση συνεχίζεται με τα 13 γονίδια του mtDNA που εμπλέκονται στο OXPHOS.

ABSTRACT

The main goal of this project is to bring evidence in support of the hypothesis of the active contribution of the mitochondrial bioenergetics to domestication events, studying sheep breeds (*Ovis aries*). The basic idea is to combine previous extended knowledge on sheep genetics, population genetics, phylogenetics and phylogeography with new data from functional genomics, bioinformatics and *in silico* analyses. The mitochondria are the main source of cellular energy production (mitochondrial bioenergetics), playing a major role in cell life and death, in differentiation of energy consuming tissues and even in whole organism development. Given the vital role of the mitochondria in the very existence of cell and organisms, their functional components are subjected to both negative and positive selection. The mitochondrial function is under the control of both the mitochondrial and nuclear genomes. Due to the cell cycle-independent replication of mtDNA, its poor repair system, and the proximity to sites of reactive oxygen species production, the mtDNA undergoes a faster mutation rate by an order of magnitude compared to nDNA (in animals), calling for tight co-evolution of genes encoding functions shared between mtDNA and nDNA. The key concept behind this project is to check for genetic differences in the 13 mitochondrial DNA genes involved in oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes between 14 different sheep breeds in order to find out the role of mitochondrial bioenergetics in domestication and breed formation. As a first step we tried to detect the neutral differentiation between 91 individuals of these breeds studying a neutral mtDNA region, the D-loop. As expected, after PCR analysis and subsequent sequencing, none or little differentiation were detected between breeds. We further continue the analysis with the 13 mtDNA OXPHOS genes.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οι ορισμοί του είδους

Μολονότι που έχουν περάσει πάνω από 300 χρόνια μετά τον πρώτο επίσημο ορισμό του βιολογικού είδους από τον Άγγλο John Ray¹ και 150 χρόνια από τη δημοσίευση του βιβλίου του Κάρολου Δαρβίνου “On the origin of species by means of natural selection” και παρόλα τα μοριακά και γενετικά δεδομένα που πλέον υπάρχουν, ο ορισμός του είδους καθώς και οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτά προκύπτουν δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι.

Για πολλά χρόνια η βάση είχε δωθεί στη μορφολογία των ειδών. Ωστόσο η μορφολογία πολλών ειδών είναι αρκετά περίπλοκη και θολώνει ακόμη περισσότερο το τοπίο. Σε κάποια είδη τα άτομα έχουν τεράστιες μορφολογικές αποκλίσεις στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξής τους ή φυλετικό διμορφισμό (Hickman, 2001). Στο άλλο άκρο βρίσκονται τα κρυπτικά είδη, που εντοπίζονται κυρίως με μοριακές τεχνικές, εφόσον οι μορφολογικές διαφορές τους είναι δυσδιάκριτες έως ανύπαρκτες και πολύ συχνά καταχωρούνται ως ένα είδος. Η μελέτη διαφόρων άλλων βιολογικών διεργασιών, (όπως π.χ. φερομόνες και καλέσματα) αποτελούν χρήσιμα βοηθήματα, αλλά είναι αρκετά δύσχρηστα εφόσον στη φύση υπάρχει ένα μεγάλο εύρος χημικών και ακουστικών σημάτων που δεν μπορούμε να εντοπίσουμε άμεσα (Bickford *et al.*, 2007). Η πλήρης κατανόηση και διευκρίνιση του ‘είδους’ γίνεται ακόμη πιο δυσεπίτευκτη αν υπολογίσουμε ότι κάποια είδη διανύουν εντονότερα μια περίοδο ειδογένεσης και οι προσπάθειες κατάταξής τους είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε διαστρευλωμένα αποτελέσματα (Hickman, 2001). Ενώ έχουν προταθεί διάφοροι ορισμοί, ο πιο αποδεκτός σήμερα είναι αυτός του **βιολογικού είδους** (biological species concept –BSC-) του Mayer (1942) –που βασίστηκε στον ορισμό του Dobzhansky (1937)- και χαρακτηρίζει το είδος ως μια ομάδα αναπαραγωγικά απομονωμένου πληθυσμού, ανεξάρτητη από άλλες παρόμοιες ομάδες. Ο ορισμός αυτός αν και αποδεκτός έχει αρκετά μειονεκτήματα. Αρχικά αποκλείει τους φυλετικά

¹ “...no surer criterion for determining species has occurred to me than the distinguishing features that perpetuate themselves in propagation from seed. Thus, no matter what variations occur in the individuals or the species, if they spring from the seed of one and the same plant, they are accidental variations and not such as to distinguish a species... Animals likewise that differ specifically preserve their distinct species permanently; one species never springs from the seed of another nor vice versa” (Ray, 1686)

αναπαραγόμενους πληθυσμούς καθώς εξ' ορισμού δεν μπορεί να έχει εφαρμογή σε αυτούς (Abbot *et al.*, 2008). Επίσης είναι προβληματικός σε περιπτώσεις όπου η αναπαραγωγική απομόνωση δεν είναι ολική (κυρίως σε φυτά) και σε πληθυσμούς που είναι γεωγραφικά απομονωμένοι καθώς η αναπαραγωγική απομόνωση είναι αναγκαστική, ενώ δεν είναι γνωστό εάν υπό άλλες συνθήκες θα μπορούσε να υπάρξει επιτυχής διασταύρωση μεταξύ τους και παραγωγή γόνιμων απογόνων (Bickford *et al.*, 2007, Futuyama, 1995). Οι δυσκολίες που αναφέρθηκαν ως προς την ταξινομική κατάταξη έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη αρκετών ακόμη ορισμών. Ένας από αυτούς είναι αυτός του **μοριακού είδους** (molecular species concept -MSC), χρήσιμος για να κατατάσσονται οι μονογονικά αναπαραγόμενοι πληθυσμοί καθώς ορίζει το είδος βασιζόμενος στην ομοιότητα βασικών γονιδιωματικών αλληλουχιών ('γονίδια κορμού') (Αλαχιώτης, 2007). Δύο άλλοι ορισμοί που έχουν προταθεί είναι αυτοί του **εξελικτικού είδους** (evolutionary species concept -ESC-) που ορίζεται από τις ξεχωριστές γενεαλογικές και φυλογενετικές ακολουθίες των πληθυσμών (King, 1993) καθώς και του **χρονοείδους** (chronospecies) που σε συνδυασμό με το εξελικτικό είδος ξεχωρίζει απολιθωμένους οργανισμούς βασιζόμενος στις μορφολογικές διαφορές σε μια εξελικτική γραμμή (Αλαχιώτης, 2007). Ένας σχετικά πρόσφατος ορισμός, είναι αυτός του **φυλογενετικού είδους** (phylogenetic species concept -PSC-) (Carcraft, 1983) που συμπεριλαμβάνει ομοιότητες σε συγκρίσιμους χαρακτήρες με βασικό όμως κριτήριο τη μονοφυλετικότητα του συνόλου που θα χαρακτηριστεί ως είδος (King, 1993).

Τα διάφορα είδη αποτελούνται από **πληθυσμούς**, δηλαδή σύνολα ατόμων τα οποία μοιράζονται μια τοπική γονιδιακή δεξαμενή και μια οικοθέση, και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους πολύ πιο έντονα απ' ό,τι αυτό συμβαίνει με άτομα του ίδιου είδους που ανήκουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Αλαχιώτης, 2007, Futuyama, 1995). Μια αρχική κατάσταση ενός πληθυσμού που σταδιακά διαφοροποιείται αποτελεί η **φυλή** -ή αλλιώς ράτσα, ποικιλία ή υποείδος- που αποτελεί μια διαφοροποιημένη, διακριτή μορφή. Οι πληθυσμοί από τους οποίους προκύπτουν οι φυλές εκτίθενται σε διαφορετικά περιβάλλοντα και παρόλο που δεν είναι αναπαραγωγικά απομονωμένοι αρχικά, αν συνεχιστεί η έκθεσή τους σε αυτά φτάνουν τελικά στην αναπαραγωγική απομόνωση, εξελίσσονται δηλαδή σε διαφορετικά είδη (άτομα του ίδιου είδους που ανήκουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Αλαχιώτης, 2007).

1.2 Η ειδογένεση, τα στάδια και οι μηχανισμοί της

Χαρακτηριστικό του γενετικού υλικού αποτελεί η δυνατότητά του να εξελιχθεί, να υπάρχει αλλαγή χαρακτηριστικών στη διάρκεια του χρόνου (Gallori *et al.*, 2012) και να καταλήξει στην **ειδογένεση**, τη δημιουργία δηλαδή ενός νέου είδους μέσα από τη χάραξη μιας καινούργιας γενεαλογικής γραμμής.

Τα αποτελέσματα της ειδογένεσης είναι πιο ξεκάθαρα στο επίπεδο του είδους, καθώς αυτό θέτει τα όρια στα οποία θα τερματιστούν οι επιδράσεις της, που ξεκινάνε όμως από τους πληθυσμούς καθώς τροποποιούνται οι συχνότητες των χαρακτηριστικών που θα περάσουν στην επόμενη γενιά αλλάζοντας έτσι τη γενετική σύσταση του πληθυσμού (Αλαχιώτης, 2007).

Η ειδογένεση σε γενικές γραμμές μπορεί να ακολουθήσει ένα από τα δυο πρότυπα: την αναγένεση ή την κλαδογένεση. Η **αναγένεση** (ή φυλετική εξέλιξη) συμβαίνει με την πάροδο του χρόνου και αναφέρεται σε γεγονότα όπως είναι η ανάπτυξη νέων οργάνων ή τρόπων αντιμετώπισης του περιβάλλοντος, αλλαγές που συμβαίνουν σε μια μονοφυλετική φυλογενετική γραμμή. Ο δεύτερος τύπος ειδογένεσης είναι η **κλαδογένεση** (ή αλλιώς πρωταρχική ή διχοτομική ειδογένεση) η οποία συμβαίνει όταν μια φυλογενετική γραμμή διασπάται δίνοντας νέες που εξελίσσονται ανεξάρτητα. Ένας ακόμη ορισμός που περιγράφει την εξελικτική πορεία ενός είδους είναι η **στασιγένεση**, που χρησιμοποιείται όμως σε περιπτώσεις όπου γενεαλογικά είδη δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες αλλαγές για μεγάλες περιόδους.

Η **πορεία της ειδογένεσης** σε ένα πληθυσμό γίνεται σε βάθος χρόνου και αποτελείται τέσσερα στάδια: αρχικά η γονιδιακή ροή μεταξύ δυο πληθυσμών είναι ακόμη μεγάλη και ενώ τα περισσότερα αλληλόμορφα αναμιγνύονται ελεύθερα, έχει αρχίσει η διαφοροποίηση στα γονίδιά τους. Κατά το δεύτερο στάδιο οι πληθυσμοί έχουν χωριστεί σε διακριτούς υποπληθυσμούς ενώ έχουν επίσης σταθεροποιηθεί οι διαφορές ανάμεσα στα αλληλόμορφά τους. Η απομόνωση ωστόσο σε αυτό το στάδιο δεν είναι ολοκληρωτική καθώς μπορεί ακόμη να υπάρξει γενετική ροή ανάμεσα στους πληθυσμούς που διαχωρίζονται σε περίπτωση που αυτοί θα έρθουν πάλι σε επαφή. Στο τρίτο στάδιο της ειδογένεσης οι παγιωμένες γενετικές διαφορές είναι ελάχιστες και οι πιθανότητες γενετικής ροής πολύ λίγες ενώ περιορίζονται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό υβριδοποίησης. Σε ένα τελικό στάδιο η αναπαραγωγική απομόνωση είναι

πλήρης όπου τα γονιδιώματα των νέων πλέον ειδών έχουν ξεκινήσει το κάθε ένα μια καινούργια γενεαλογική γραμμή (Αλαχιώτης, 2007).

Ο τρόπος διαχωρισμού ενός νεοσύνθετου είδους όσον αφορά το γεωγραφικό του διαχωρισμό μπορεί να είναι: **παραπάτριος** (να επικοινωνούν και διασταυρώνονται κατά μήκος μιας μόνο στενής γεωγραφικής ζώνης), **αλλοπάτριος** (πλήρης γεωγραφική απομόνωση) ή **συμπάτριος** (η ειδογένεση συμβαίνει χωρίς να υπάρξει γεωγραφική απομόνωση) (Futuyama, 1995).

Οι φραγμοί που δημιουργούνται στα διάφορα στάδια της ειδογένεσης και προκαλούν τη γεωγραφική και την αναπαραγωγική απομόνωση χωρίζονται σε προσυζευκτικούς και μετασυζευκτικούς. Οι **προσυζευκτικοί φραγμοί** ουσιαστικά εμποδίζουν το σχηματισμό ζυγωτών ανάμεσα στους πληθυσμούς και είναι δυνατόν να σχετίζονται με το διαφορετικό χώρο διαβίωσης τους ή τις οικολογικές τους συνήθειες (οικολογική απομόνωση) την περίοδο κατά την οποία αναπαράγονται (εποχιακή/χρονική απομόνωση) την απουσία προσέλευσης μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών (φυλετική/ηθολογική απομόνωση, ή απομόνωση που οφείλεται σε διαφορετικούς επικοινωναστές) και τέλος στη μη συμβατότητα των γεννητικών οργάνων ή γαμετών (μηχανική/γαμετική απομόνωση). Οι **μετασυζευκτικοί φραγμοί** αφορούν τη βιωσιμότητα ή τη γονιμότητα των υβριδίων, που μπορεί να είναι μειωμένη είτε στην F_1 γενιά (αβιωσιμότητα υβριδίων) είτε στην F_2 ή σε επαναδιασταυρώσεις (κατάρρευση υβριδίων) ακόμη και να δίνουν βιώσιμα αλλά στείρα υβρίδια (στειρότητα υβριδίων) (Αλαχιώτης, 2007).

Οι **βασικοί μηχανισμοί της εξέλιξης**, που ευθύνονται για τις αλλαγές στη γενετική δομή ενός πληθυσμού είναι πέντε: μεταλλάξεις, ανασυνδυασμός, γενετική ροή, γενετική παρέκκλιση και φυσική επιλογή. Οι δύο πρώτοι δίνουν στο γενετικό υλικό τη βάση για την ποικιλομορφία: οι **μεταλλάξεις** εμπλουτίζουν τη γενετική δεξαμενή των πληθυσμών με αλληλόμορφα και ο **γενετικός ανασυνδυασμός** δημιουργώντας ακόμη μεγαλύτερη ποικιλότητα, ενώ οι υπόλοιποι επηρεάζουν το πως μεταβιβάζονται και εδραιώνονται τα αλληλόμορφα αυτά στους πληθυσμούς με τυχαίο ή μη τυχαίο τρόπο: Η **γενετική ροή** είναι αποτέλεσμα της μετανάστευσης μεταξύ των πληθυσμών αλλά η αποτελεσματικότητά του μηχανισμού αυτού εξαρτάται από τις διαφορές στη γενετική δομή των πληθυσμών καθώς και από το μέγεθος της μετανάστευσης. Η **γενετική παρέκκλιση** εκφράζει τις τυχαίες αλλαγές που διαφοροποιούν τις συχνότητες των αλληλομόρφων σε έναν πληθυσμό. Έχει επιρροή ιδιαίτερα στους μικρούς πληθυσμούς όπου μπορεί να μειωθεί η ετεροζυγωτία

(συνεπώς και η ποικιλότητα) σε βαθμό όπου όλα τα άτομα θα καταλήξουν σε ομοζυγωτία. Τέλος η **φυσική επιλογή** είναι καταλυτική στην εξέλιξη καθώς ωθεί τη διαιώνιση κάποιων αλληλομόρφων, τα οποία αυξάνουν τις πιθανότητες για επιβίωση και αναπαραγωγή στα άτομα που τα φέρουν, σε σχέση με άτομα του ίδιου είδους/πληθυσμού που είναι φορείς άλλων αλληλομόρφων. Συνολικά αυτό ορίζεται ως προσαρμοστικότητα ή καταλληλότητα. Η φυσική επιλογή μαζί με τη μετανάστευση και την παρέκκλιση δρουν εφ' όσον υπάρχει η γενετική βάση για ποικιλότητα –που προέρχονται από τις μεταλλάξεις και τον ανασυνδυασμό-, ενώ όσο μεγαλύτερη είναι η ποικιλότητα αυτή σε έναν πληθυσμό, τόσο μεγαλύτερο είναι το εξελικτικό δυναμικό του (Fox *et al*, 2006). Η συνεργιστική δράση των μηχανισμών αυτών είναι που δημιουργεί τις συνθήκες προκειμένου τελικά να επιλέγονται τα πιο λειτουργικά αλληλόμορφα (με βάση πάντα το περιβάλλον στο οποίο ζει ο κάθε πληθυσμός) για κληρονόμηση στις επόμενες γενιές δίνοντας έτσι τους πολυμορφισμούς που θα χαρακτηρίσουν τον πληθυσμό αυτό (Hartl *et al.*, 1997).

Ο τρόπος που επηρεάζονται τα διάφορα τμήματα του γονιδιώματος ενός οργανισμού από το περιβάλλον και κυρίως ο βαθμός στον οποίο συμβαίνουν μεταλλάξεις, ποικίλει. Το ελάχιστο ποσοστό του DNA το οποίο κωδικοποιείται (σε πολύ γενικές γραμμές 1.5 - 2%) και δίνει λειτουργικές πρωτεΐνες βρίσκεται κάτω από στενό έλεγχο μέσω του μηχανισμού της φυσικής επιλογής, καθώς επηρεάζει άμεσα την επιβίωση και αναπαραγωγή των οργανισμών (Nielsen, 2005). Αυτή η λειτουργία ονομάζεται **προσαρμοστική εξέλιξη** και αφορά τα λειτουργικά γονίδια με όλα τα αλληλόμορφα τους. Μπορεί να έχει αρνητική δράση, εξαλείφοντας μια μετάλλαξη αρνητική για την επιβίωση ή θετική δράση, να επιτρέπει δηλαδή την εμφάνιση ενός νέου αλληλομόρφου αν αυτό θα επιφέρει αναπαραγωγική επιτυχία (δηλαδή αν θα έχει αρμοστικότητα) με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητάς και την κληρονόμησή του, τροποποιώντας σταδιακά τη γενετική σύσταση του πληθυσμού για την καλύτερη προσαρμογή του. Αρκετές φορές, πολλοί διαφορετικοί γενότυποι –και κατ' επέκταση φαινότυποι- μπορεί να έχουν την ίδια αρμοστικότητα. Τότε ονομάζονται ουδέτεροι και βρίσκονται υπό την επιρροή της **ουδέτερης εξέλιξης**. Οι νέες μεταλλάξεις που δεν επηρεάζουν την αρμοστικότητα ενός γονιδίου ονομάζονται και αυτές ουδέτερες όπως και οι συνώνυμες μεταλλάξεις. Η ουδέτερη εξέλιξη αφορά και εκείνες τις περιοχές του γονιδιώματος που δεν μεταφράζονται (εσώνια, ψευδογονίδια) καθώς δεν υπόκεινται σε εξελικτικές πιέσεις (δεν έχουν κάποια κατεύθυνση οι αλλαγές τους) και αυτό αποδεικνύεται από τον γρηγορότερο ρυθμό

μετάλλαξης που έχουν. Η ουδετερότητα βέβαια είναι κάτι σχετικό, καθώς η δημιουργία της ποικιλότητας λόγω των αλλαγών μπορεί να είναι ουδέτερη σε ένα περιβάλλον αλλά όχι σε ένα άλλο. Τα ουδέτερα αλληλόμορφα αφού δεν εξαλείφονται, παραμένουν σε ένα πληθυσμό και κληρονομούνται. Έτσι σε περιπτώσεις που θα συμβούν γεγονότα όπως είναι η γενετική παρέκκλιση, θα επηρεαστούν και αυτά με τις συχνότητές τους να παρεκκλίνουν αλλάζοντας το γενετικό υπόβαθρο. Στις περιπτώσεις πάλι που είναι συνδεδεμένα με γενετικούς τόπους σαν ομάδα -σε απλότυπους- που σχετίζονται με την αρμοστικότητα του οργανισμού, πάλι θα επηρεαστούν οι συχνότητές τους με μη τυχαίο τρόπο, λόγω του φαινομένου της ανισορροπίας σύνδεσης (Αλαχιώτης, 2007).

1.3 Μοριακοί δείκτες

Η μελέτη της ποικιλομορφίας των οργανισμών, καθώς και η φυλογενετική τους κατάταξη και ταξινόμηση, μπορεί να γίνει μέσω δεικτών οι οποίοι μπορεί να είναι φαινοτυπικοί, βιοχημικοί ή μοριακοί. Οι **φαινοτυπικοί δείκτες** (π.χ. μορφολογία, φυσιολογία) παρόλο που σε αρκετές περιπτώσεις αποδίδουν ικανοποιητικά τις πραγματικές εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ειδών, δεν επαρκούν, ενώ -όπως έχει ήδη αναφερθεί- υπάρχουν περιπτώσεις όπου διαστρευλώνουν τα αποτελέσματα αφού η εκτίμησή τους είναι κατά βάση υποκειμενική. Έτσι, ενώ χρησιμοποιήθηκαν ευρέως τα πρώτα χρόνια για την περιγραφή των σχέσεων μεταξύ οργανισμών, τη θέση τους στη συνέχεια κατέλαβαν τα άλλα δυο είδη δεικτών.

Οι **βιοχημικοί δείκτες** συγκρίνουν πρωτεΐνες/ισοένζυμα/αλλοένζυμα, δευτερογενείς μεταβολίτες και γενικότερα προϊόντα βιοχημικών αντιδράσεων συγκρίνοντας το ηλεκτροφορητικό τους πρότυπο. Υπάρξαν περισσότερο επιτυχείς και ακριβείς από τους μορφολογικούς, καθώς είναι πιο αντικειμενικοί ενώ μπόρεσαν να εντοπίσουν και κρυπτικά είδη (Kocher *et al.*, 1997, Strauss *et al.*, 1990). Ωστόσο, το γεγονός ότι δέχονται υψηλές επιλεκτικές πιέσεις και αναφέρονται σε χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από το περιβάλλον ή/και από το αναπτυξιακό στάδιο, ακόμη και από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατά την έκφρασή τους, τους καθιστά ευάλωτους και σε αρκετές περιπτώσεις δύσχρηστους.

Καθώς η βάση του μηχανισμού της εξέλιξης και κατ' επέκταση της ειδογένεσης είναι η σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων, η σύγκριση μεταξύ των νουκλεοτιδικών

αλληλουχιών γονιδιωμάτων αποκαλύπτει το πότε τα γονιδιώματα αυτά διαχωρίστηκαν από ένα προγονικό (γενετική διαφοροποίηση) και το μέγεθος των διαφορών. Έτσι, οι **μοριακοί δείκτες** αναδείχθηκαν στην πλέον διαδεδομένη και εύχρηστη ομάδα δεικτών. Βασίζονται στην ανάλυση των γενετικών πολυμορφισμών και εξετάζουν την ποικιλότητα στο νουκλεοτιδικό επίπεδο (Strauss *et al.*, 1990) ελέγχοντας ένα σχετικά απεριόριστο αριθμό χαρακτήρων καθώς παρέχουν και τη δυνατότητα σύγκρισης λιγότερο ή περισσότερο συγγενικών ταξινομικών ομάδων (Kocher *et al.*, 1997). Πιο αναλυτικά, είναι μικρότερα ή μεγαλύτερα πολυμορφικά τμήματα DNA, έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί η ποικιλομορφία μεταξύ των οργανισμών και η κληρονομικότητά τους (Staub *et al.*, 2004). Για να μπορεί ένας μοριακός δείκτης να είναι αποτελεσματικός θα πρέπει να μην επηρεάζεται από το περιβάλλον, από την επίσταση και από άλλα πλειοτροπικά φαινόμενα (Agarwal *et al.*, 2008). Λόγω αυτού, οι περισσότεροι δείκτες, αντιστοιχούν σε λιγότερο λειτουργικά τμήματα του γονιδιώματος στα οποία δεν ασκούνται εξελικτικές πιέσεις (Chauchan *et al.*, 2010) και ανήκουν έτσι στην ουδέτερη γενετική ποικιλότητα (Holderegger *et al.*, 2006). Πρέπει να είναι πολυμορφικοί σε μεγάλο βαθμό και να κληρονομούνται με Μεντελική κληρονομικότητα, καθώς μόνο έτσι θα είναι χρήσιμοι στο εντοπισμό της ποικιλομορφίας μεταξύ των οργανισμών. Επίσης, να εντοπίζονται και να χαρακτηρίζονται εύκολα και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και φάσεις του οργανισμού με μεγάλο επίπεδο ανάλυσης ώστε να φαίνονται ικανοποιητικά οι γενετικές διαφορές μεταξύ των οργανισμών. Ακόμη, σημαντικό είναι, να καλύπτουν μεγάλο μέρος του γονιδιώματος χωρίς να συμπεριλαμβάνουν πολύπλοκες δομές όπως μεταθετά στοιχεία και ψευδογονίδια. Δε θα πρέπει να έχουν μεγάλο κόστος ούτε να χρειάζεται μεγάλη ποσότητα δείγματος. Τέλος ιδανικό, αλλά όχι και απαραίτητο, θα ήταν να μη χρειάζεται να είναι προηγουμένως γνωστό κάτι σχετικά με το γονιδίωμα του υπό μελέτη οργανισμού. Φυσικά δεν είναι δυνατό να μπορούν να ισχύσουν όλα τα παραπάνω για ένα δείκτη, αλλά κάποια κριτήρια είναι υποχρεωτικά (Agarwal *et al.*, 2008). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται μια γενική κατάταξη της καταλληλότητας των μοριακών μεθόδων ανάλογα με το ποιές ταξινομικές ομάδες είναι υπό σύγκριση (Πίνακας 1).

Ιεραρχικό επίπεδο	Ανοσολογία πρωτεϊνών	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	DNA-DNA υβριδοποίηση	RFLP			Αλληλούχηση DNA
				mtDNA	scnDNA	VNTR- loci	
Γενετική ομοιότητα	—	*	—	*	*	**	*
Γενεαλογία (parentage)	—	*	—	*	**	**	*
Πληθυσμοί ίδιου είδους	—	**	—	**	**	*	*
Συγγενικά είδη	*	**	*	*	*	—	*
Ενδιάμεσες ταξινομικές μονάδες	**	*	**	—	—	—	**
Μεγάλοι διαχωρισμοί >50 mya	*	—	*	—	—	—	**

Πίνακας 1: Αποδοτικότητα των διαφόρων μοριακών μεθόδων ανάλογα με την ιεραρχία των taxa προς ανάλυση και το είδος της σύγκρισης:

* δείχνει την καταλληλότητα

– ακατάλληλη μέθοδος (Swofford *et al.* 1990)

Η πιο ολοκληρωμένη και σίγουρη μέθοδος εντοπισμού πολυμορφισμών είναι η **αλληλούχηση**. Από τις πλέον χρησιμοποιούμενες είναι η μέθοδος Sanger με χρήση τριφωσφορικών 2',3' διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) τα οποία προσδένονται σε μια σεσημασμένη αναπτυσσόμενη αλυσίδα μέσω των 5' τριφωσφορικών ομάδων τους, αλλά λόγω του ότι υπολείπονται των 3'-Ο ομάδων, δεν μπορούν να ενωθούν με το επόμενο τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP). Πραγματοποιώντας έτσι τέσσερις αντιδράσεις την κάθε μια με ένα διαφορετικό ddNTP (για τις τέσσερις πιθανές βάσεις) και τις υπόλοιπες βάσεις με κανονικά dNTPs, το αποτέλεσμα είναι πολλές αλυσίδες διαφορετικών μηκών, όπου η σειρά τους βρίσκεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και κατόπιν διαβάζονται με αυτοραδιογραφία. Επίσης αποτελεσματική μέθοδος αλληλούχησης είναι αυτή των Hunkapiller και Hood. Σε αυτή τη μέθοδο, τα dNTPs είναι σεσημασμένα με τέσσερα διαφορετικά χρώματα (ένα για την κάθε βάση) έτσι ώστε να πραγματοποιείται μια μόνο αντίδραση και η σειρά των βάσεων να διαβάζεται με χρήση λείζερ σε αυτοματοποιημένες συσκευές (Watson *et al.*, 2007).

1.4 Η γονιδιωματική εξέλιξη και τα φυλογενετικά δέντρα

Για να συγκριθούν τα πειραματικά αποτελέσματα ως προς τη συγγένεια των διαφόρων ταξινομικών ομάδων είναι απαραίτητη η **χρήση στατιστικών μεθόδων**. Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται για αναλύσεις τέτοιου είδους βασίζονται σε πιθανούς ρυθμούς νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών υποκαταστάσεων καθώς και των τύπων τους (μεταπτώσεις - μεταστροφές), οι οποίοι έχουν υπολογιστεί από διάφορες μελέτες. Οι ρυθμοί αυτοί δεν είναι ιδιαίτερα σταθεροί και έχει παρατηρηθεί ένα μεγάλο εύρος καταστάσεων μεταξύ των διαφόρων οργανισμών. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια μεγάλων εξελικτικών περιόδων μπορεί να υπολογιστεί ένας σχετικά σταθερός ρυθμός (**υπόθεση μοριακού ρολογιού**). Τα εξελικτικά δέντρα έχουν σαν στόχο να παρουσιάσουν τις πραγματικές γενεαλογικές σχέσεις μεταξύ των οργανισμών και να χρονολογηθούν τα σημεία όπου έχει συμβεί ειδογένεση (διάσπαση από ένα κοινό πρόγονο), όπως συμβαίνει με τα **φυλογενετικά δέντρα**. Μια άλλη μορφή που βασίζεται στις αλληλουχίες ενός ή λίγων γονιδίων, είναι τα **γονιδιακά δέντρα** τα οποία μπορεί να βρίσκονται σε συμφωνία ή ασυμφωνία με τα φυλογενετικά. Τα δέντρα μπορεί να έχουν ρίζα (να φαίνεται ο κοινός πρόγονος και η εξελικτική κατεύθυνση) ή να είναι άρριζα και τα μήκη των βραχιόνων τους να αντιπροσωπεύουν το χρόνο ανάμεσα στις διασπάσεις των ειδών.

Υπάρχουν δύο βασικές **μέθοδοι κατασκευής δέντρων** μέσω προγραμμάτων που βασίζονται σε αλγόριθμους: οι **μέθοδοι μητρώων απόστασης** (distance matrix methods) που υπολογίζουν τις νουκλεοτιδικές/αμινοξικές διαφορές για όλα τα ζευγάρια (UPGMA, Fitch – Margoliash, μέθοδος μετασχηματισμένων αποστάσεων) και οι **μέθοδοι που βασίζονται στην παρουσία ή απουσία πληροφοριακών χαρακτήρων** με τις οποίες δημιουργούνται πολλά δέντρα, αλλά επιλέγεται αυτό με τις μικρότερες αποστάσεις ως το πιθανότερο σωστό (μέγιστη φειδωλότητα, μέγιστη πιθανοφάνεια, μπεισιανή ανάλυση).

Η κάθε κατηγορία έχει διάφορες παραμέτρους όπου θα πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά και να ταιριάζουν στον εξελικτικό μηχανισμό για τις υπό μελέτη ταξινομικές μονάδες, κάτι που σημαίνει ότι θα πρέπει πριν από την κατασκευή του δέντρου να έχει γίνει μια διελεύκανση των μηχανισμών αυτών. Αν δε δοθεί η κατάλληλη σημασία σε αυτό το σημείο, οι εξελικτικές καταστάσεις μπορεί να απλοποιηθούν πολύ οδηγώντας σε μια εντελώς διαφορετική κατεύθυνση καθώς

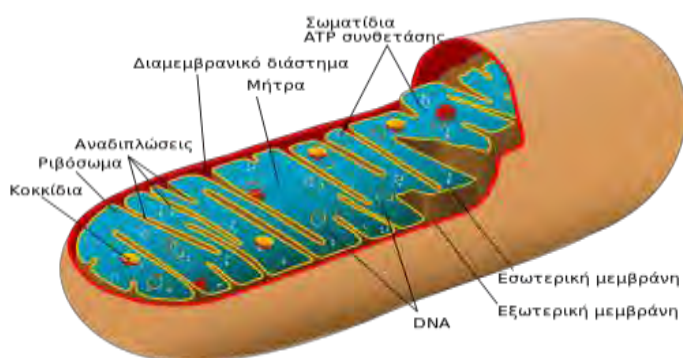
επηρεάζονται από περίπλοκες διαδικασίες: μεταλλάξεις, φυσική επιλογή, τυχαία γενετική παρέκκλιση, ομομιξία ακόμη και επαναλήψεις των μεταλλάξεων και παράλληλες μεταλλάξεις σε περιπτώσεις που η εξέλιξη είναι μακροπρόθεσμη. Έτσι μπορεί να δημιουργηθούν προβλήματα αντιστοίχισης ανάμεσα σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες καθώς δεν θα είναι γνωστοί τυχόν διπλασιασμοί ή ελλείμματα. Γενεαλογικές γραμμές που συμπεριλαμβάνονται σε ένα δέντρο μπορεί να έχουν πολύ διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης και θα πρέπει αυτές που διαφέρουν αρκετά να αγνοηθούν. Τέλος προσοχή πρέπει να δοθεί έτσι ώστε να μη γίνεται σύγκριση ανάμεσα σε παράλογα γονίδια, καθώς έχουν εξελιχτεί στην ίδια ταξινομική ομάδα, παρά μόνο στα ορθόλογα που είναι πραγματικοί μάρτυρες της ειδογένεσης (Αλαχιώτης, 2001).

1.5 Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργάνδια των ευκαρυωτικών κυττάρων και λειτουργούν ως τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας των κυττάρων αυτών, αλλά και ολόκληρου του οργανισμού. Κατέχουν έτσι κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό και σε άλλες σημαντικές λειτουργίες όπως στην απόπτωση, θερμογένεση, διαφοροποίηση και ανάπτυξη, στην αύξηση των νευρικών αξόνων, τη δυναμική ρύθμιση της ικανότητας αναπνοής και του κυτταρικού κύκλου γενικότερα (McBride, 2006, Boore, 1999). Λόγω του ρόλου τους στην παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας μέσω του **συστήματος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS)**, βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες σε κύτταρα με αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις όπως είναι τα μυϊκά, νευρικά, τα κύτταρα των αισθητήριων, τα ωάρια κτλ. Ένα κύτταρο μπορεί να έχει από εκατοντάδες έως και χιλιάδες μιτοχόνδρια αλλά ο αριθμός τους, το σχήμα τους (συνήθως ωοειδές) και η φάση στην οποία βρίσκονται (σχάση ή σύντηξη) μπορεί να αλλάζει ανάλογα με την κατάσταση στη οποία βρίσκεται το κύτταρο (Alberts *et al.*, 2002).

Αποτελούνται από δυο μεμβράνες, μια εξωτερική η οποία είναι κυλινδρική και λεία με πρωτεΐνες μεταφοράς -πορίνες- και μια εσωτερική με αναδιπλώσεις (cristae). Οι μεμβράνες αυτές στο σύνολό τους ονομάζονται μιτοχονδριακός φάκελλος και ο χώρος ανάμεσά τους, που βοηθάει στη επικοινωνία μεταξύ τους με τη βοήθεια υγρού, διαμεμβρανικός. Στις εσωτερικές πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης δημιουργείται

ακόμα ένας χώρος, η μήτρα (matrix) στον οποίο βρίσκονται τα ενζυμικά συστήματα (αναπνευστική αλυσίδα: σύμπλοκο αφυδρογονάσης NADH, κυτοχρωμάτων b-c1 και οξειδάσης κυτοχρώματος), που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας, καθώς και τα ριβοσώματα μαζί με το DNA του μιτοχονδρίου (Εικόνα 1). Εκεί απελευθερώνεται ενέργεια κατά τον μεταβολισμό των ήδη διασπασμένων μακρομορίων που προσλαμβάνει ο οργανισμός με τις τροφές και μετατρέπονται σε ATP (Alberts *et al.*, 2002, Xing *et al.*, 2012).



Εικόνα 1: Δομή μιτοχονδρίου

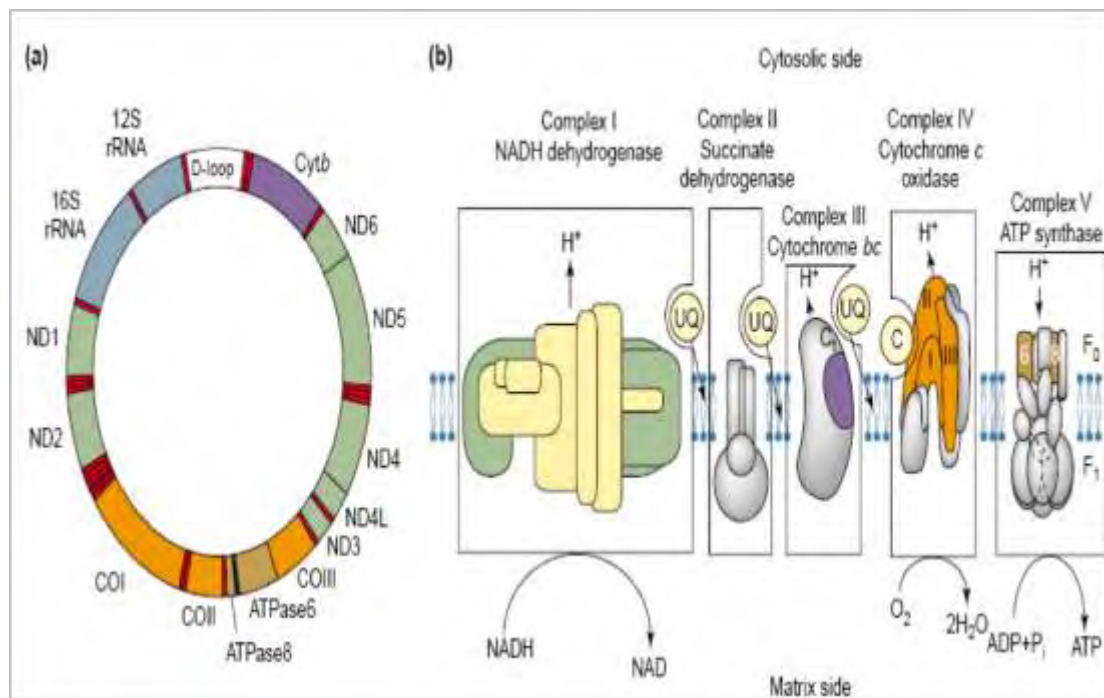
Κάθε μιτοχόνδριο έχει το δικό του γενετικό υλικό, κάτι που εξηγείται από την ανεξάρτητη προέλευσή του² το οποίο είναι δίκλωνο και κυκλικό σχεδόν σε όλα τα πολυκύτταρα ζώα (εκτός από κάποια Κνιδόζωα) (Boore, 1999), μικρό (15-20 kb), χωρίς ιστόνες και υπάρχει σε δύο έως και δέκα αντίγραφα μέσα στο κάθε οργανίδιο. Μαζί με αυτό, υπάρχει και ένα ολοκληρωμένο βιοσυνθετικό σύστημα δημιουργίας RNA και έκφρασης των πρωτεϊνών του οργανιδίου (mtDNA, ριβοσώματα), κάτι που κάνει το μιτοχόνδριο **ημιαυτόνομο**. Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες συντίθενται από το πυρηνικό DNA και τα ριβοσώματά του και εισέρχονται στο μιτοχόνδριο μέσω του κυτταροπλάσματος αλλά αρκετά συντίθενται στη μήτρα του μιτοχονδρίου από το mtDNA και τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα και έτσι δεν εξέρχονται καθόλου στο κυτταρόπλασμα.

Το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται με διαφορετικό τρόπο από τα χρωμοσώματα καθώς μεταφέρεται στους απογόνους μέσω της κυτταροπλασματικής κληρονομής και αυτοπολλαπλασιάζεται, πολλαπλασιάζεται δηλαδή ανεξάρτητα από το πυρηνικό

² Ενδοσυμβιωτική θεωρία: Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες έχουν προέλθει λόγω συμβίωσης ενός προκαρυωτικού αερόβιου οργανισμού με έναν από τους πρώτους αναερόβιους οργανισμούς (κύτταρο-ξενιστής). Συγκεκριμένα ο πρόγονος των μιτοχονδρίων πιστεύεται ότι ήταν ένα πρωτεοβακτήριο και των χλωροπλάστων ένα κυανοβακτήριο που στη πορεία εξελίχθηκαν μαζί με τον ξενιστή και κατέληξαν σαν οργανιδιά. Η θεωρία αυτή αναπτύχθηκε από την Lynn Margulis το 1967 και είναι η πιο δημοφιλής όσον αφορά την προέλευση των οργανιδίων αυτών.

DNA. Το κυτταρόπλασμα που κληρονομείται είναι αυτό του πατρός και έτσι η μεταφορά του μιτοχονδριακού DNA γίνεται μόνο μέσω της μητέρας (στη συντριπτική πλειοψηφία των ειδών που έχουν μελετηθεί). Επομένως, οι απόγονοι μπορεί να επηρεαστούν, εκτός από το γενετικό υλικό του πυρήνα και από τα συστατικά του κυτταροπλάσματος του πατρός φαινόμενο γνωστό ως **μητρική επίδραση** το οποίο διαρκεί συνήθως για μια γενιά (Futuyma, 1995).

Ένα τυπικό μιτοχονδρικό DNA έχει συνολικά 37 γονίδια: 13 πρωτεϊνικές υπομονάδες ενζύμων της εσωτερικής μεμβράνης τα οποία εμπλέκονται στην ΟXPHOS, τα δυο rRNAs των ριβοσωμάτων του μιτοχονδρίου καθώς και 22 tRNAs τα οποία είναι απαραίτητα για τη μετάφραση πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτό (Boore, 1999) (Εικόνα 2). Οι δυο αλυσίδες του mtDNA είναι η βαριά (heavy, H) και η ελαφριά (light, L). Τα γονίδια μπορεί να είναι συγκεντρωμένα στη μια αλυσίδα αλλά συνήθως μοιράζονται και στις δυο -κάτι που ισχύει για τα θηλαστικά- όπου τα εξόνια είναι πολύ πυκνά διατεταγμένα με μικρές μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες (εσώνια) στο ενδιάμεσο. Η μεταγραφή γίνεται έτσι και στις δυο αλυσίδες, αν και τα περισσότερα γονίδια συγκεντρώνονται στη βαριά αλυσίδα, που είναι και αυτή που κυρίως μεταφράζεται, ενώ στην ελαφριά υπάρχουν κάποια γονίδια tRNA (Brown *et al.*, 1979). Τα περισσότερα γονίδια όμως που κωδικοποιούν υπομονάδες για το σύστημα της ΟXPHOS, βρίσκονται στο πυρηνικό DNA και η συνεργασία των δυο αυτών 'ομάδων' γονιδίων (του mtDNA και του nDNA) είναι απολύτως απαραίτητη για την αναπνοή και κατά συνέπεια για την επιβίωση (Lane, 2009).



Εικόνα 2: (a) Τα μιτοχονδριακά γονίδια κωδικοποιούν για 11 πεπτιδικές υπομονάδες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και 2 πεπτίδια του συμπλόκου της ΑΤΡασης. Τα υπόλοιπα γονίδια κωδικοποιούν 2 μιτοχονδριακά rRNAs και 22 tRNAs για το μιτοχονδριακό σύστημα μετάφρασης, όπως και αλληλουχίες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή και την αντιγραφή (η περιοχή D-loop).
 (b) 7 πεπτίδια (ND1 – ND6) είναι υπομονάδες του συμπλόκου I (NADH – ubiquinone oxidoreductase): συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στη ουβικινόνη (UQ) και σαν αντλία πρωτονίων από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Το σύμπλοκο III (ubiquinol – cytochrome c oxidoreductase) αποτελείται από 11 υπομονάδες αλλά μόνο το κυτόχρωμα b κωδικοποιείται από το mtDNA. Το σύμπλοκο αυτό καταλύει την οξείδωση της ουβικινόλης, τη αναγωγή του κυτοχρώματος c και τη μετατόπιση πρωτονίων. Οι 3 μεγαλύτερες υπομονάδες του συμπλόκου IV (κυτοχρωμική c οξειδάση), COI, II και III κωδικοποιούνται επίσης από το mtDNA. Είναι το τελευταίο ενζυμικό σύμπλεγμα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το το κυτόχρωμα c στο μοριακό οξυγόνο. Αποτελείται από 13 υπομονάδες, από τις οποίες 3 βασικές κωδικοποιούνται από το mtDNA. 2 στοιχεία του συμπλόκου της ΑΤΡάσης (V), τα ΑΤΡαση6 και ΑΤΡαση8 επίσης κωδικοποιούνται από το mtDNA. Το σύμπλοκο αυτό μεταφέρει πρωτόνια κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Blair *et al.*, 2001).

Μια από τις μη κωδικοποιούσες περιοχές είναι αρκετά μεγάλη, ονομάζεται περιοχή ελέγχου/ρυθμιστική περιοχή (control region) ή πιο συνηθισμένα **D-loop** (βρόχος εκτόπισης/Displacement loop) και περιέχει στοιχεία ελέγχου της αντιγραφής και της μεταγραφής (Boore, 1999). Η περιοχή αυτή μπορεί να διαιρεθεί σε 3 μέρη: Την κεντρική επικράτεια (domain) που περιλαμβάνει την περιοχή έναρξης της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας και είναι σχετικά συντηρημένο. Γύρω από αυτή την περιοχή βρίσκονται οι επικράτειες I και II, οι οποίες είναι υπέρ-πολυμορφικές (hypervariable) και επιρρεπείς σε υποκαταστάσεις καθώς και σε indels

(ενθέσεις/ελλείμματα). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της περιοχής είναι οι συνεχόμενες επαναλήψεις μικρών τμημάτων DNA (variable number tandem repeats) και είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο τα μεγέθη mtDNA εμφανίζουν ποικιλομορφία μεγέθους (Wan *et al.*, 2004).

1.6 Τα μιτοχόνδρια ως μοριακός δείκτης

Λόγω του **πολύ γρήγορου ρυθμού εξέλιξης** του μιτοχονδριακού DNA (σε αντίθεση με τον γενικό κανόνα της μοριακής εξέλιξης που θέλει τα τμήματα τα οποία εκτελούν σημαντικές για την επιβίωση λειτουργίες να εξελίσσονται αργά) (Brown *et al.*, 1979) το mtDNA αποτελεί βασικό εργαλείο στη μελέτη της φυλογένεσης και της **γενετικής πληθυσμών** ως ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος μοριακός δείκτης στα ζώα (Hurst *et al.*, 2005) τόσο σε μικροεξελικτικές (στο επίπεδο του είδους και κάτω) όσο και σε μακροεξελικτικές μελέτες (στο επίπεδο της οικογένειας και πάνω). Συγκεκριμένα στα θηλαστικά ο ρυθμός με τον οποίο συμβαίνουν οι συνώνυμες νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις υπολογίζεται να είναι $5,7 \times 10^{-8}$ υποκαταστάσεις (ανά θέση) ανά μονάδα χρόνου, ρυθμός δέκα φορές γρηγορότερος από αυτόν του nDNA. Ως αποτέλεσμα, τα είδη που έχουν μικρές διαφορές στο nDNA να εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις στο mtDNA. Ο ρυθμός για τις μη συνώνυμες υποκαταστάσεις είναι εξίσου υψηλός χωρίς όμως να μπορεί να υπολογιστεί ένας αντικειμενικός μέσος όρος, λόγω της μεγάλης ποικιλότητας ρυθμών μετάλλαξης των διαφόρων περιοχών. Οι ρυθμοί αυτοί πιστεύεται ότι είναι περισσότερο αποτέλεσμα τυχαίων μεταλλάξεων, ενώ οι περιπτώσεις στις οποίες την εδραίωσή τους έχει επηρεάσει και η φυσική επιλογή, περιορίζονται σε κάποιους απλότυπους. Είναι ίσως το τελικό αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, με βασικότερους τη χαμηλή πιστότητα της μιτοχονδριακής πολυμεράσης (Pol gamma) και την ανεπάρκεια του μιτοχονδριακού μηχανισμού επιδιόρθωσης (Αλαχιώτης, 2007, Alberts *et al.*, 2002). Αρκετές μεταλλάξεις μπορεί επίσης να προκαλούνται από τον υψηλό αριθμό ελεύθερων ριζών, εδώ ως παραπροϊόντα της αναπνοής, λόγω της γειννίασης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσα στο μιτοχόνδριο (Xing *et al.*, 2012). Ακόμη, ο υψηλός ρυθμός ανάπλασης (turnover rate) του μιτοχονδρίου συνεπάγεται πιθανώς και περισσότερες μεταλλάξεις (Brown *et al.*, 1979). Μια άλλη παράμετρος

είναι ότι ο **ρυθμός σταθεροποίησης των μεταλλάξεων** (mutation fixation rate) είναι υψηλός και σταθερός σε όλα τα είδη κάτι που μπορεί να οφείλεται είτε στους χαλαρούς λειτουργικούς περιορισμούς που έχουν τα μιτοχονδριακά γονίδια, είτε στην περίσσεια των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων (πολλά οργανίδια σε κάθε κύτταρο και πολλά αντίγραφα mtDNA σε κάθε οργανίδιο), που σημαίνει ότι ακόμα και να μεταλλαχθούν κάποια γονίδια σε μη κωδικα, ο φαινότυπος δε θα επηρεαστεί καθώς το κάθε κύτταρο είναι κατά μια έννοια πολυπλοειδικό για τα γονίδια του μιτοχονδρίου (Brown *et al.*, 1979). Σε αντίθεση με τους ρυθμούς εξέλιξης του, η **διάταξη των γονιδίων του mtDNA** είναι σταθερή κυρίως γιατί δεν παρατηρούνται αλλαγές σε αλληλουχίες (ανακατατάξεις πολλών βάσεων) αλλά μόνο σημειακές μεταλλάξεις (αφαιρέσεις, προσθήκες και αντικαταστάσεις μιας μόνο βάσης). Αυτό επιβεβαιώνεται από μελέτες υβριδισμού και στοιχεία που δείχνουν ότι το σημείο έναρξης της αντιγραφής, καθώς και τα γονίδια του rRNA έχουν την ίδια θέση, κατεύθυνση αντιγραφής αλλά και μεταγραφής σε εξελικτικά πολύ απομακρυσμένα είδη όπως ο άνθρωπος, ο βάτραχος και η φρουτόμυγα (Brown *et al.*, 1979).

Η χρήση του mtDNA ως μοριακού δείκτη έχει και άλλα πλεονεκτήματα. Υπάρχει σε **πολλά αντίγραφα** σε ένα κύτταρο κάνοντας έτσι ένα μικρό ή ένα σχεδόν κατεστραμμένο δείγμα επαρκές για απομόνωση mtDNA (Michaels *et al.*, 1982) και για πολλαπλασιασμό με PCR. Λόγω του υψηλού ρυθμού μεταλλάξεών του, μια πιο μικρή αλληλουχία (σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA) είναι συνήθως επαρκής για να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε φυλογενετικές αναλύσεις (Sun *et al.*, 2006). Η **μητρική μονογονεϊκή κληρονομήση** που συνεπάγεται **απουσία ανασυνδυασμών**, αποτελεί πλεονέκτημα για τη δημιουργία ξεκάθαρων φυλογενετικών δέντρων (Avisé, 1983, Klutsch *et al.*, 2011, Allendorf *et al.*, 2008). Η μονογονεϊκή κληρονομήση ωστόσο δεν είναι απόλυτη, καθώς μελέτες σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών έδειξαν εν μέρη και πατρική κληρονομήση κυρίως σε οργανισμούς που αναπαράγονται φυλετικά (έχει βρεθεί σε ποντίκια και ανθρώπους) και λιγότερο σε αυτούς που αναπαράγονται μη φυλετικά (Piganeau *et al.*, 2004, Allendorf *et al.*, 2008).

Τα παραπάνω θετικά όμως μπορεί να επισκιάσει η **ετεροπλασμία** του mtDNA: Κάθε οργανισμός ή κύτταρο μπορεί να περιέχει πάνω από ένα μιτοχονδρικό απλότυπο που προκύπτει συνήθως λόγω μεταλλάξεων στο απολειδικό γονιδίωμα και οι οποίες μέχρι την εγκαθίδρυση είτε του μεταλλαγμένου, είτε του αγρίου τύπου οδηγούν αναγκαστικά σε ποικιλότητα. Παρόλο που η εγκαθίδρυση συνήθως απαιτεί ένα μέσο όρο 200 γενεών (όπως στον άνθρωπο αλλά και σε κάποια ψάρια),

εγκαθίδρυση σημειακών μεταλλάξεων έχει παρατηρηθεί και σε λίγες έως και μια γενιά και αυτό ίσως θολώνει ακόμη περισσότερο τις αναλύσεις (Klutsch *et al.*, 2011). Η απότομη συγκέντρωση πολλών διαφορετικών απλοτύπων μπορεί να οφείλεται επίσης στο φαινόμενο της «στενωπού» όταν κατά την ωογένεση μειώνεται ο αριθμός των mtDNA, οδηγώντας σε τυχαία γενετική παρέκκλιση και διαφορετικές αναλογίες ετεροπλασμίας μεταξύ αδερφών ή και μεταξύ μητέρας-παιδιού (Brown *et al.*, 2001). Η ετεροπλασμία επεκτείνεται ακόμα και ανάμεσα στους ιστούς ενός ατόμου (μωσαϊκισμός) και αυτό ίσως να δυσχεραίνει περισσότερο τις αναλύσεις (Klutsch *et al.*, 2011). Ένα ακόμη στοιχείο που μπορεί να κάνει τα αποτελέσματα δυσνόητα είναι ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των οργανιδίων, μιτοχονδριακά γονίδια που συνεχώς μίκραιναν σε μέγεθος εισέρχονταν στο πυρινηκό DNA δημιουργώντας έτσι σταδιακά μια υπεροικογένεια πυρινηκού μιτοχονδριακού DNA (Numt). Αυτά είναι ψευδογονίδια εξαιτίας των διαφορών του γενετικού κώδικα μιτοχονδρίων και πυρήνα και σε αρκετά είδη, μπορούν να υπάρξουν σε πολλά αντίγραφα στον πυρήνα με ελάχιστες διαφορές (Wan *et al.*, 2004). Κατά τον στοχευμένο πολλαπλασιασμό mtDNA αλληλουχιών, είναι πολύ πιθανό να πολλαπλασιαστούν και Numts που έχουν συντηρημένα κάποια τμήματα ίδια με των εκκινητών. Τέλος, το mtDNA ως μοριακός δείκτης, μπορεί να αποκαλύψει τη φυλογενετική διαδρομή μόνο των θηλυκών ατόμων ενός είδους/πληθυσμού. Τα μειονεκτήματά αυτά ωστόσο είναι λιγότερο ουσιώδη από αυτά του nDNA (ως δείκτη), έτσι το mtDNA έχει καθιερωθεί ως ένας από τους αποτελεσματικότερους μοριακούς δείκτες (Hurst *et al.*, 2005) και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη διερεύνηση των εξελικτικών και φυλογενετικών σχέσεων πολλών ταξινομικών ομάδων ειδών ψαριών, πουλιών, ερπετών και θηλαστικών (Chauchan, 2010).

Διάφορες μιτοχονδριακές περιοχές χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες (κωδικές και μη). Από αρκετές μελέτες, το γενικό συμπέρασμα είναι πως είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται πολλές και μικρές περιοχές (Non *et al.*, 2007). Ο ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του mtDNA ποικίλει και έτσι διαφορετικά τμήματα χρησιμοποιούνται για τα διαφορετικά είδη φυλογενετικών αναλύσεων. Ανάλογα με το τι συγκρίνεται (απομακρυσμένες ταξινομικές ομάδες, γειτονικοί πληθυσμοί κτλ) θα πρέπει αναλόγως να χρησιμοποιούνται και οι αντίστοιχες περιοχές: Το rDNA κομμάτι **12S** είναι μια πολύ καλά συντηρημένη περιοχή και έτσι χρησιμοποιείται για να συγκρίνει ομάδες στο επίπεδο του φύλου/ υποφύλου. Το **16S**

είναι ελάχιστα πιο συντηρημένο και είναι κατάλληλο για συγκρίσεις στο επίπεδο των οικογενειών ή και ακόμη για σπάνια γένη. Τμήματα που εξελίσσονται λίγο γρηγορότερα, είναι ιδανικά σαν δείκτες σε επίπεδα οικογενειών, γενών και ειδών (Wan *et al.*, 2004) όπως είναι κάποια τα οποία μεταφράζονται σαν υπομονάδες της OXPHOS, για παράδειγμα το γονίδιο **COI** που είναι συντηρημένο αλλά μπορεί να διαφοροποιείται ανάμεσα σε είδη (Heim *et al.*, 2007) και το γονίδιο **Cyt-b** που έχει γρήγορα εξελισσόμενες περιοχές κωδικονίων αλλά και άλλες που εξελίσσονται πιο αργά (Farias *et al.*, 2001). Γενικότερα, έχει διερευνηθεί σε βάθος η καταλληλότητα των 13 γονιδίων της OXPHOS ως μοριακοί δείκτες σε φυλογενετικές σχέσεις και έχουν καταταχθεί σε 5 κατηγορίες με φθίνουσα σειρά επιτυχίας (Miya *et al.*, 2000) (Πίνακας 2).

Κατηγορίες επιτυχίας δεικτών των 13 γονιδίων της OXPHOS					
Δείκτες	πολύ χρήσιμος	χρήσιμος	μέτριος	ελάχιστα χρήσιμος	καθόλου χρήσιμος
ND1				+	
ND2			+		
ND3			+		
ND4	+				
ND4L					+
ND5	+				
ND6					+
cyt b		+			
COI	+				
COII		+			
COIII	+				
ATPase 6				+	
ATPase 8					+

Πίνακας 2: Καταλληλότητα των 13 γονιδίων της OXPHOS ως μοριακοί δείκτες, όπως εξετάστηκαν από τους Miya & Nishida (Miya *et al.*, 2000)

Για **ενδοειδικές μελέτες**, τα πιο κατάλληλα τμήματα του mtDNA είναι οι υπερμετάβλητες περιοχές της **D-loop** περιοχή I και II, λόγω του πολύ γρήγορου ρυθμού μεταλλάξεων. Παρόλα αυτά μπορεί κάποιοι απλότυποι ακόμα και στις

υπερμετάβλητες περιοχές να είναι ιδιαίτερα διαδεδομένοι και κάποιοι άλλοι “ενδιάμεσοι” να έχουν χαθεί, κάνοντας μια έρευνα ίσως να αποτυπώνει μόνο την τωρινή κατάσταση και όχι όλες τις αλλαγές της γενετικής δομής στην πορεία του χρόνου. Τα διαφορετικά μεγέθη των επαναλαμβανόμενων επαναλήψεων της D-loop (που αλλάζουν το συνολικό μέγεθος του mtDNA) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες ενδοειδικά, καθώς εντοπίζονται αλληλόμορφα μεγέθους ακόμη και σε ένα άτομο, με επιφύλαξη όμως γιατί μπορεί το αποτέλεσμα να αλλοιωθεί από διάφορους παράγοντες: διαφορετικές συνθήκες PCR/πηκτώματος, μη ομογενοποιημένοι ιστοί (Wan *et al.*, 2004).

1.7 OXPHOS και συνεξέλιξη μιτοχονδριακού-πυρηνικού DNA

Η σημαντικότητα των μιτοχονδριακών γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) αποδεικνύει ότι **εξελικτική ουδετερότητα του mtDNA είναι ένα απλοϊκό και λανθασμένο συμπέρασμα** και παρόλο που ο ρυθμός εξέλιξής του είναι γρήγορος, τα **περισσότερα mt γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της OXPHOS είναι ιδιαίτερα συντηρημένα**. Η ποικιλότητα των γονιδίων αυτών μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη απόδοση του μεταβολισμού και η παρατηρούμενη αυτή ποικιλομορφία είναι πιθανό να έχει **σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή του οργανισμού**. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η τελευταία ίσως να είναι ο λόγος που κάποια είδη έχουν μεγάλη εξάπλωση καταλαμβάνοντας ένα εύρος περιβαλλόντων και υιοθετούν διαφορετικές συνθήκες (Fonseca *et al.* 2008) καθώς, λόγω της άμεσης σχέσης της OXPHOS με το μεταβολισμό και την αναπνοή, πιθανόν να αυξάνονται οι γονιδιακές επιλογές για προσαρμογή σε διαφορετικά είδη διατροφής και ενδιαιτήματα (υγρασία, ξηρασία, κρύο κτλ) (Lane, 2009). Η εξελικτική αυτή προσαρμογή, που ίσως οφείλεται στη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα κάποιων mtDNA απολοτύπων, σε συνδυασμό με στοιχεία που δείχνουν ότι τα προϊόντα των γονιδίων τους παίζουν ρόλο στη **δημιουργία αναπαραγωγικών φραγμών** στα ζώα, κάνει το mtDNA ένα υποψήφιο γενετικό **μηχανισμό ειδογένεσης** (Gershoni, 2009, Dowling, 2007). Η δημιουργία των οποιονδήποτε φραγμών είναι πιθανόν να οφείλεται στη μη συμβατότητα των μιτοχονδριακών OXPHOS γονιδίων -και κατ' επέκταση μη συνεργασίας τους- με τα πυρηνικά γονίδια που σχετίζονται με την OXPHOS, καθώς η

ασυμβατότητα αυτή οδειγεί στη δυσλειτουργία του τόσο σημαντικού για την επιβίωση μηχανισμού της αναπνοής, με συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο. Στο επίπεδο του οργανισμού μπορεί να επέλθει δυσλειτουργία κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ή αρκετά μειωμένη αρμοστικότητα μετά τη γέννησή του (υβριδική κατάρρευση). Το μεγαλύτερο εμπόδιο στην αρμονική συνεργασία των δύο γονιδιακών ομάδων αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξής τους που, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει μεγάλες αποκλίσεις (το mtDNA εξελίσσεται 10-30 φορές πιο γρήγορα από ότι το nDNA). Επιπλέον τα πυρηνικά γονίδια ανασυνδυάζονται και κάθε γενιά μπορεί να έχει διαφορετικά αλληλόμορφα, δίνοντας διαφορετικά γενετικά υποστρώματα. Η ικανοποιητική λειτουργία της OXPHOS ωστόσο, παρόλα τα 'εμπόδια', έρχεται να επιβεβαιώσει τη δύναμη της φυσικής επιλογής, η οποία «συντονίζει» τους τόσο διαφορετικούς εξελικτικούς ρυθμούς των δύο γονιδιωμάτων (Lane, 2009). Αμφότερα φαίνεται να δέχονται τα αποτελέσματα της θετικής επιλογής, να προσαρμόζονται και να συν-εξελίσσονται (Blie et al, 2001). Ο συγχρονισμός αυτός έχει αποδειχτεί και πειραματικά σε μια μελέτη όπου υπολογίστηκαν οι εξελικτικοί ρυθμοί των συμπλόκων της OXPHOS και το συμπέρασμα ήταν ότι ο ρυθμός του nDNA ακολούθησε την ταχύτητα του mtDNA, αποδεικνύοντας τη **συνεξέλιξή** τους μέσα σε ένα πληθυσμό (Mishmar et al, 2006). Είναι πολύ πιθανό να είναι αυτή η βάση της ειδογένεσης των απομονωμένων πληθυσμών, καθώς μια ομάδα γονιδίων πολύ σημαντικών για την επιβίωση εξελίσσεται με δεκαπλάσιο ρυθμό απ' ότι τα υπόλοιπα γονίδια, οδηγώντας σε αναπαραγωγικούς φραγμούς λόγω της ταχύτατης απόκλισης που θα έχουν οι πληθυσμοί αυτοί στις λειτουργίες της αναπνοής (Lane, 2009). Λόγω του μειωμένου αριθμού μελετών αναφορικά με το κατά πόσο ο μιτοχονδριακός ρυθμός εξέλιξης θα μπορούσε να είναι η κινητήριος δύναμη της ειδογένεσης, τίποτα δεν πρέπει να θεωρείται δεδομένο. Σύμφωνα με ερευνητές οι έρευνες θα πρέπει να εστιάσουν στις ταξινομικές ομάδες με υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης του mtDNA όπως είναι τα θηλαστικά (Lane, 2009).

1.8 Το είδος *Ovis aries*

Τα οικόσιτα πρόβατα (*Ovis aries*) είναι το πιο κοινό μέλος της οικογένειας των προβάτων (*Ovis*). Είναι τετράποδα μηρυκαστικά, με τεράστια οικονομική σημασία κυρίως για το μαλλί, το κρέας και το γάλα τους. Κατά τη διάρκεια της βοσκής καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες από νωπά χόρτα, τα οποία καταπίνουν και διατηρούν αμάσητα στο στομάχι τους και τα αναμασούν κατά τη διάρκεια της ημέρας. Τα μεγέθη των κοπαδιών είναι από μικρά έως μέτρια και είναι ιδιαίτερα κοινωνικά ζώα. Είναι πολυγαμικά και τα θηλυκά γεννούν μια φορά τον χρόνο 4-5 αρνιά (η διάρκεια της κύησης είναι 5 μήνες), τα οποία και αναγνωρίζουν από τη μυρωδιά ενώ η διάρκεια ζωής τους κυμαίνεται από 10 – 15 έτη (Jensen, 2009). Η συστηματική ταξινόμηση είναι η εξής:

Βασίλειο	:	Ζώα	(<i>Animalia</i>)
Συνομοταξία	:	Χορδωτά	(<i>Chordata</i>)
Ομοταξία	:	Θηλαστικά	(<i>Mammalia</i>)
Τάξη	:	Αρτιοδάκτυλα	(<i>Artiodactyla</i>)
Οικογένεια	:	Βοοειδή	(<i>Bovidae</i>)
Υποοικογένεια	:	Αιγώδη	(<i>Caprinae</i>)
Γένος	:	Πρόβατο	(<i>Ovis</i>)
Είδος	:	Οικόσιτο πρόβατο	(<i>O. aries</i>)

Τα Αρτιοδάκτυλα υπήρξαν από τις πιο επιτυχημένες τάξεις του Πλειστόκαινου, με ευρύτατη γεωγραφική εξάπλωση σε περιοχές που εκτείνονται από την Ευρώπη στη Σιβηρία και από την Αλάσκα στη Νότιο Αμερική. Τα πρόβατα είναι από τα πρώτα ζώα που εξημερώθηκαν προερχόμενα από άγριες φυλές προβάτων στην περιοχή της Εύφορης Ημισελήνου -από αγρότες της Νεολιθικής εποχής- πριν από περίπου 12,000 χρόνια. Σταδιακά με τη απόλυτη εξημέρωσή τους και τις συνεχόμενες διασταυρώσεις, ανάλογα με το ποιά παραγωγή ήθελε να ενισχύσει ο κάθε αγρότης, δημιουργήθηκαν φυλές πολύ διαφορετικές σε μορφολογία και στα προϊόντα που δίνουν. Το τελευταίο είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο και διαχωρίζονται και επιλέγονται οι φυλές: άλλες είναι ιδανικές για την παραγωγή κρέατος, γάλακτος, δέρματος ή μαλλιού, ακόμη και για διαφορετικούς συνδυασμούς αυτών (Jensen,

2009). Πολλές έρευνες στο mtDNA των προβάτων δείχνουν ότι η εξημέρωσή τους έγινε από περισσότερους από έναν άγριους πληθυσμούς -πιστεύεται ότι είναι έξι-όπως είναι το mouflon (*O. orientalis*) που έχει συνεισφέρει γονιδιακά στις Ευρωπαϊκές κυρίως φυλές και το argali (*O. ammon*) που είναι πιο κοντά στις γονιδιακές δεξαμενές των οικόσιτων προβάτων της Ασίας. Σε συνδυασμό με τη μεταγενέστερη εξάπλωση και εκτροφή τους, σήμερα υπάρχουν >14,000 φυλές προβάτων και ο πληθυσμός τους παγκοσμίως υπολογίζεται στο ένα δισεκατομμύριο (Meadows *et al.*, 2007, Groenevelt *et al.*, 2010, Jensen, 2009).

Στην Ελλάδα που θεωρείται ότι έχει μια **πολύτιμη γενετική δεξαμενή** προβάτων, υπάρχουν 26 φυλές που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλότητα σε μορφολογία και προσοδοφόρα χαρακτηριστικά καθώς και πολύ καλή προσαρμοστικότητα στην μεγάλη εναλλαγή περιβαλλόντων (Boyazoglu *et al.*, 1990, Ligda *et al.*, 2009). Οι ντόπιες μικρές φυλές είναι πάρα πολλές καθώς στα αρχαία χρόνια η κτηνοτροφία παρουσίαζε τεράστια ανάπτυξη. Διασταυρώσεις με φυλές από τα Βαλκάνια έχουν επηρεάσει τους βόρειους πληθυσμούς, ενώ οι φυλές που βρίσκονται ανατολικά καθώς και αυτές των νησιών του Αιγαίου έχουν αναμειχθεί με φυλές της Ανατολής. Στην περιοχή των Ιωαννίνων, οι φυλές έχουν διασταυρωθεί με Γερμανικά πρόβατα και φυλές της Ιταλίας έχουν αναμειχτεί με πληθυσμούς στα νησιά του Ιονίου. Επίσης, το ποικιλόμορφο κλίμα με τις μικρο-κλιματικές τοπικές συνθήκες του (εναλλαγή εποχών, ξηρό κλίμα, υγρασία) και η γεωγραφία της Ελλάδας (πολλά και διαφορετικά υψόμετρα, θάλασσα, νησιά, πεδιάδες) (Boyatzoglu *et al.*, 1990) δίνουν έδαφος για να δοκιμαστεί και να διαφοροποιηθεί η ήδη πλούσια γενετική βάση που υπάρχει.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η εργασία αυτή εντάσσεται σε ένα ευρύτερο πρόγραμμα που είναι η διερεύνηση του πιθανού ρόλου της μιτοχονδριακής βιοενεργητικής στην ειδογένεση, ελέγχοντας την επίδραση των 13 mt γονιδίων που κωδικοποιούν για υπομονάδες του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) στη δημιουργία ξεχωριστών φυλών.

Η βασική ιδέα έχει προέλθει από στοιχεία προηγούμενων ερευνών, που δείχνουν ότι τα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) τα οποία κωδικοποιούν για 13 πρωτεϊνικές υπομονάδες του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) - συγκεκριμένα των συμπλόκων I, III, IV και V -, ευθύνονται για αλλαγές προσαρμογής στο περιβάλλον οι οποίες δημιουργούν αναπαραγωγικούς φραγμούς ανάμεσα στους απομονωμένους πληθυσμούς διαφόρων ειδών, κάτι που αντιτίθεται στην ιδέα της εξελικτικής ουδετερότητας των γονιδίων αυτών.

Το mtDNA έχει πολύ υψηλούς ρυθμούς μεταλλάξεων αλλά και πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των οργανισμών λόγω της παραγωγής της απαιτούμενης ενέργειας, μέσω της OXPHOS, της οποίας η μη αποτελεσματική λειτουργία οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και σε πολλές ασθένειες στο επίπεδο του οργανισμού. Παράλληλα, τα μιτοχονδριακά γονίδια στο πλαίσιο της OXPHOS συνεργάζονται και με ~ 80 πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπόλοιπες υπομονάδες. Η αποτελεσματική συνεργασία των τελευταίων με τα μιτοχονδριακά -άρα και συνεξέλιξή τους- είναι απολύτως απαραίτητη για την επιβίωση.

Παρόλα αυτά, πριν περάσουμε στη διαφοροποίηση των 13 λειτουργικών μιτοχονδριακών γονιδίων, ως πρώτο βήμα θεωρήσαμε ότι θα πρέπει να ελεγχθεί η «ουδέτερη» διαφοροποίηση μεταξύ των φυλών των προβάτων.

Εδώ η μελέτη έγινε σε 14 φυλές προβάτων από διαφορετικές περιοχές, για τις οποίες προσπαθήσαμε να βρούμε διαφοροποιήσεις μεταξύ των φυλών στην εξελικτικά ουδέτερη περιοχή του mtDNA τη D-loop, χρησιμοποιώντας 91 άτομα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα (αίμα, γάλα) από διάφορες φυλές προβάτων στάλθηκαν σαν δείγματα από πιστοποιημένες καθαρές φυλές από διάφορα σημεία της Ελλάδας όπως φαίνεται στην εικόνα 3:



Εικόνα 3: Περιοχές δειγματοληψίας

ΟΙ ΦΥΛΕΣ:

Οι 14 αυτόχθονες φυλές προβάτων της Ελλάδας που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας αυτής ήταν οι ακόλουθες:

- | | |
|-------------------|---|
| 1. Θράκης: | Προσαρμοσμένη στις ορεινές περιοχές, προέρχεται από την Τουρκική φυλή Kivircik. |
| 2. Σαρακατσάνικη: | Ίδια προέλευση και προσαρμογή με της Θράκης. |
| 3. Κοζάνης: | Πολύ καλή προσαρμογή σε άγονα περιβάλλοντα. Προέρχεται από τη Ουγγρική φυλή Zackel. |

4. Φλώρινας: Αυτόχθονη φυλή των χαμηλότερων υψομέτρων της βόρειας Ελλάδας και της πρώην Γιουγκοσλαβικής Δημοκρατίας της Μακεδονίας.
5. Ορεινή Ηπείρου (Μπούτσικη): Προσαρμοσμένη φυλή στις ορεινές περιοχές της Ηπείρου και της Δυτικής Μακεδονίας. Προέρχεται από την Ούγγρική φυλή Zackel.
6. Καραμάνικη: Πεδινή Ήπειρος. Προέλευση από φυλές της Κεντρικής Τουρκίας.
7. Κατσικά (Ιωαννίνων): Προσαρμοσμένη σε χαμηλά υψόμετρα στην Ήπειρο. Διασταύρωση της Καραμάνικης με την Ορεινή Ηπείρου.
8. Άρτας (Φριζάρτα): Προσαρμοσμένη σε χαμηλά υψόμετρα. Διασταύρωση ντόπιας φυλής με πρόβατα της Φριςλανδίας (Γερμανία).
9. Ζακύνθου: Προσαρμοσμένο στις συνθήκες που επικρατούν σε νησιά. Πιθανή προέλευση η ιταλική φυλή Berkamasca.
10. Κύμης (Ευβοίας): Παρόμοια χαρακτηριστικά και προέλευση με της Ζακύνθου.
11. Πηλίου: Βουνίσια φυλή. Προέρχονται από τη φυλή Zackel της Ουγγαρίας.
12. Σκοπέλου: Προσαρμοσμένη σε νησιώτικο περιβάλλον. Διασταύρωση μιας αυτόχθονης φυλής των Σποράδων και φυλών της Ανατολίας (Τουρκία).
13. Άργους: Προσαρμοσμένη σε χαμηλά υψόμετρα. Αυτόχθονη φυλή της κεντρικής Ελλάδας.
14. Χίου: Προσαρμοσμένη σε νησιώτικο κλίμα και συνθήκες. Διασταύρωση μεταξύ μιας ντόπιας Χιώτικης φυλής και φυλών που προέρχονται από την Ανατολία (Τουρκία).

3.2 Απομονώσεις:

3.2.1 Απομόνωση ολικού DNA με SSC Buffer

Υλικά

- Γάντια
- Στατώ
- Πιπέττες ακριβείας: 10 μ l, 1000 μ l
- Ακρορύγχια (αντίστοιχα για τις πιπέττες)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 ml

Συσκευές

- Μηχανικός αναδευτήρας (vortex)
- Φυγόκεντρος
- Κλίβανος
- Λουτρό ύδατος με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία
- Περιστροφικός αναδευτήρας φιαλιδίων
- Απαγωγός

Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο νερό (ddH₂O)
- Ρυθμιστικό διαλυμα SSC (Saline-Sodium Citrate) Buffer 1X *
pH=7
- Πρωτεϊνάση K (Proteinase K)
- Φαινόλη (Phenol)
- Χλωροφόρμιο (Chloroform)
- Οξικό νάτριο (CH₃COONa ή NaOAc) 3M pH 5.3
- Ισοπροπανόλη (Isopropanol)
- Αιθανόλη (Ethanol) 70%
- Δωδεκανικό θειικό νάτριο (SDS) 5%

*SSC Buffer 1X για 1L :

NaCl (0,15 M)
Na₃CH₆H₅O₇ κιτρικό νάτριο (0,015 M)
ddH₂O → τελικός όγκος: μέχρι το 1L
Ρύθμιση pH με HCl

Αρχή της μεθόδου:

Το ρυθμιστικό διάλυμα SSC (pH=7) διατηρεί το DNA σταθερό ρυθμίζοντας το pH, ενώ το χλωριούχο νάτριο (NaCl) που περιέχει διασπά τα κύτταρα καθώς αλλάζει την ωσμωτική πίεση τα διογκώνει και λύονται. Το δωδεκανικό θειικό νάτριο (SDS) είναι ένα απορρυπαντικό που μειώνει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις διασπώντας έτσι την πυρηνική μεμβράνη. Ακόμη λειτουργεί σαν αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών, διασπώντας τις νουκλεάσες ενώ ταυτόχρονα τις καταβυθίζει, απελευθερώνοντας το DNA στο διάλυμα. Η πρωτεΐνάση K επίσης αποικοδομεί τις πρωτεΐνες και οι νουκλεάσες καταστρέφονται ολοκληρωτικά. Η φαινόλη βοηθά το DNA να μείνει στην υπερκείμενη υδατίνη φάση, ενώ το χλωροφόρμιο διαχωρίζει τις φάσεις καλύτερα. Το DNA είναι αδιάλυτο στην αιθανόλη και την ισοπροπανόλη, έτσι τα μόρια του σχηματίζουν συσσωματώματα στο οποίο βοηθάει και η προσθήκη του οξικού νατρίου (NaOAc) με αποτέλεσμα να είναι διακριτό στην αλκοολική φάση με μορφή ινών και να γίνεται εύκολη η συλλογή τους. (Marmur 1961, Wasko *et al.*, 2003).

Εφαρμογή της μεθόδου:

1. Σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1.5 ml μεταφέρθηκαν 500 μl από το δείγμα αίματος.
2. Προστέθηκε 1 ml διαλύματος SSC 1X.
3. Τα δείγματα αναδεύτηκαν με vortex και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2' στις 13,000 rpm.
4. Αμέσως μετά απομακρύνθηκε με προσοχή το υπερκείμενο και προστέθηκε ακόμα 1 ml SSC 1X.
5. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 2' στις 13,000 rpm και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο.
6. Προστέθηκαν 700 μl NaOAc, 50 μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K και αφού καλύφθηκε το πώμα με Parafilm επωάστηκαν για 1 ώρα στους 55°C.
7. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2' στις 13,000 rpm και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf των 1.5 ml.
8. Στα δείγματα προστέθηκε 1 ml φαινόλη και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10' στις 13.000 rpm στους 4°C.

9. Η επάνω υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο Eppendorf και προστέθηκαν 0.5 ml φαινόλης, 0.5 ml χλωροφόρμιο και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 5'.
10. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο Eppendorf των 1.5 ml και προστέθηκε 1ml ισοπροπανόλη.
11. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 20°C για 20'.
12. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30' στις 13,000 rpm στους 4°C.
13. Αφαιρέθηκε με προσοχή όλο το υπερκείμενο έτσι ώστε να παραμείνει το ίζημα στο σωληνάριο.
14. Προστέθηκε 1 ml αλκοόλη 100%.
15. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5' στις 13,000 rpm στους 4°C.
16. Απομακρύνθηκε η αλκοόλη και τα δείγματα μεταφέρθηκαν στους 37°C για 30' για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αλκοόλης.
17. Τέλος προστέθηκαν 100 μl ddH₂O.

3.2.2 Απομόνωση ολικού DNA μέσω kit με στήλες διοξειδίου του

πυριτίου (kit: Purification of Genomic DNA Using PureLink™ Silica Columns της εταιρίας Life Technologies Corporation)

Υλικά

- Γάντια
- Στατώ
- Πιπέττες ακριβείας: 10 μl, 1000 μl
- Ακρορύγχια (αντίστοιχα για τις πιπέττες)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 2 και 1.5 ml

Συσκευές

- Μηχανικός αναδευτήρας (vortex)
- Φυγόκεντρος
- Λουτρό ύδατος με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία

Αντιδραστήρια

- 100% Αιθανόλη
- Proteinase K

- PureLink Genomic Lysis/Binding (έτοιμο στο kit)
- Wash Buffer (έτοιμο στο kit)
- Genomic Elution Buffer (έτοιμο στο kit)

Αρχή της μεθόδου:

Το kit έχει σχεδιαστεί για γρήγορη και εύκολη απομόνωση ολικού DNA από ιστούς θηλαστικών καθώς μετά από λύση των κυττάρων, το DNA συνδέεται με τα μόρια του διοξειδίου του πυριτίου της στήλης και παραμένει εκεί, ενώ τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με πλύση. Τελικά το DNA λαμβάνεται με πλύση. Αρχικά γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων με πρωτεϊνάση K και διάλυμα που περιέχει SDS (όπως προαναφέραμε προκαλούν λύση των κυττάρων και αποικοδόμηση νουκλεασών), RNase (διάσπαση RNA) και με πρόσθεση χαοτροπικών αλάτων και αιθανόλης πραγματοποιείται η πρόσδεση του DNA στις στήλες, μια αντιστρέψιμη διαδικασία. Τα υπολείμματα αφαιρούνται μέσω πλύσεων με διαλύματα και το DNA συλλέγεται με ένα ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα έκλουσης (Boom *et al.*, 1990, Life TechnologiesTM Protocols online manual).

Εφαρμογή της μεθόδου:

1. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο που είχε ρυθμιστεί στους 50°C μέχρι να ξεπαγώσουν.
2. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 1ml από το κάθε δείγμα (10,000 rpm για 5') και το ίζημα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια Eppendorf των 2 ml όπου προστέθηκαν 180 µl Lysis Buffer και ακολούθησε επώαση για 30' σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προστέθηκαν 20 µl Proteinase K και έγινε ανάμειξη με τη βοήθεια vortex.
4. Προστέθηκαν 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding και αναμείχθηκαν αμέσως με τη χρήση vortex.
5. Επώαστηκαν στους 55°C για 30'.
6. Αμέσως μετά προστέθηκαν 200 µl 100% αιθανόλης και έγινε καλή ανάμειξη με τη βοήθεια vortex.
7. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε στήλες PureLink, έγινε φυγοκέντρηση στις 10,000 x g για 1' σε θερμοκρασία δωματίου και οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέα σωληνάρια συλλογής PureLink Collection Tubes.

8. 500 µl Wash Buffer 1 προστέθηκαν στις στήλες και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 10,000 x g για 1' σε θερμοκρασία δωματίου και οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέα σωληνάρια συλλογής PureLink Collection Tubes.
9. Προστέθηκαν 500 µl Wash Buffer 2 και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στη μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα για 3' σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Η στήλες τοποθετήθηκαν σε καθαρά σωληνάρια Eppendorf των 1.5 µl.
11. Προστέθηκαν 200 µl Genomic Elution Buffer επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1' και έγινε φυγοκέντρωση στη μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα για 1' σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Τα σωληνάρια Eppendorf περιέχουν απομονωμένο DNA (πρώτο elution).
13. Οι στήλες τοποθετήθηκαν σε καθαρά σωληνάρια Eppendorf των 1.5 µl και το βήμα 12 επαναλήφθηκε δίνοντας απομονωμένο DNA (δεύτερο elution).

3.3 Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Υλικά

(για ηλεκτροφόρηση)

- Γάντια
- Στατώ
- Ζυγαριά ακριβείας
- Πιπέττες ακριβείας: 10 µl
- Ακρορύγχια (αντίστοιχα για τις πιπέττες)
- Κωνική φιάλη των 100 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 10 µl
- Ειδικό πιατάκι για για την παρασκευή πηκτώματος με χτενάκι

(για φωτομέτρηση)

- Κυψελίδες
- Πιπέττες ακριβείας: 100 µl, 10 µl

Συσκευές

(για ηλεκτροφόρηση)

- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (οριζόντιας) με τροφοδοτικό

- Συσκευή παροχής UV ακτινοβολίας με προστατευτικό καπάκι

(για φωτομέτρηση)

- Φωτόμετρο

Αντιδραστήρια

(για ηλεκτροφόρηση)

- Αγαρόζη (Agarose)
- TAE (Tris-Acetate-EDTA) 50X *
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) Bromophenol blue 6X **
- Βρωμιούχο Αιθίδιο (Ethidium bromide-EtBr) C=10mg/ml
- ddH₂O (για φωτομέτρηση)
- ddH₂O

*TAE 50X (500 ml): 121 g Tris Base (1.98M)
28.5 ml Acetic Acid (0.95M)
50 ml EDTA (0.05M)
ddH₂O έως τελικό όγκο 10 ml

**Loading buffer 6X(10ml): 1ml Bromophenol blue 1%w/v (0.015M)
0.5ml TBE 20X
5ml Glycerol
ddH₂O έως τελικό όγκο 10 ml.

Αρχή της μεθόδου:

Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος στο εκάστοτε δείγμα μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Ο ένας είναι μέσω ηλεκτροφόρησης του δείγματος και μέτρηση της απορρόφησης υπεριώδους (ultraviolet - UV) ακτινοβολίας στα ακόλουθα μήκη κύματος: 230, 260 και 280 nm η οποία θα δείξει σε γενικές γραμμές της ποσότητα του γενετικού υλικού, το μέγεθος καθώς και τη στερεοδιάταξη των τμημάτων (υπερελικωμένο, γραμμικό, κυκλικό). Επίσης, έλεγχος της καθαρότητας του DNA γίνεται με αραίωση του 1:50 (με ddH₂O) και φωτομέτρηση στα 260 nm όπου θα πρέπει να έχει ένδειξη καθαρής καμπύλης.

3.3.1 Ηλεκτροφόρηση

Ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε αρχικά μετά την απομόνωση του ολικού DNA από τους ιστούς (αίμα, γάλα) καθώς και μετά την ολοκλήρωση της PCR για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης. Η βασική ιδέα είναι ότι πηκτώματα από αγαρόζη ή πολυακρυαλαμίδη που έχουν ηλεκτρόδια στα δύο άκρα τους, λειτουργούν σαν επιλεκτικά φίλτρα για μόρια DNA με διαφορετικά μοριακά βάρη τα οποία απομακρύνονται από το ένα ηλεκτρόδιο προς το άλλο με διαφορετικούς ρυθμούς σχηματίζοντας ξεχωριστές μπάντες. Αυτό συμβαίνει όταν εφαρμόζεται τάση στα δύο άκρα του πηκτώματος και τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA κινούνται από το αρνητικό ηλεκτρόδιο (κάθοδο) προς το θετικό (άνοδο), σε ουδέτερο pH το οποίο διατηρείται από το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (TAE). Όσο πιο αυξημένη είναι η τάση τόσο πιο γρήγορα κινούνται τα μόρια, δεν πρέπει όμως να υπερβεί κάποια όρια καθώς υπάρχει κίνδυνος να λιώσει το πηκτωμα. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, οι θέσεις που έχουν πάρει τα διαφορετικά τμήματα DNA μπορούν να γίνουν ορατές στο υπεριώδες φως με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου (είτε στο πηκτωμα είτε στο δείγμα), μια βαφή που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα μόρια του DNA και τα κάνει να φωσφορίζουν. Το πόσο γρήγορα έχει κινηθεί ένα τμήμα στο πηκτωμα, είναι αντιστρόφως ανάλογο του μεγέθους του και έτσι τα μεγαλύτερα τμήματα θα βρίσκονται σε υψηλότερο σημείο από τα μικρότερα που ελίσσονται γρηγορότερα στους πόρους του πηκτώματος. Την κίνηση των μορίων επηρεάζει επίσης η συγκέντρωση της αγαρόζης, το μέγεθος της τάσης (Volt), η στερεοδιάταξη των τμημάτων καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα φόρτωσης προστίθεται στα δείγματα για να αυξήσει την πυκνότητά τους έτσι ώστε να φορτωθούν στις κατάλληλες θέσεις χωρίς να διαχυθούν ενώ η χρωστική που περιέχει κινείται προς τη άνοδο με προβλέψιμο ρυθμό και παράλληλα κάνει τα δείγματα ορατά (Hoezel, 1998).

Μια μπάντα με ικανοποιητική συγκέντρωση DNA και χωρίς προσμίξεις (RNA, πρωτεΐνες) θα είναι ευκρινής και μονή.

3.3.2 Φωτομέτρηση

Αν ένα δείγμα περιέχει DNA χωρίς προσμίξεις (φαινόλη, αγαρόζη, πρωτεΐνες, άλλα νουκλεϊκά οξέα) μπορεί να μετρηθεί το ποσό της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας που θα απορροφήσουν οι βάσεις του. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης θα πρέπει να γίνεται στα 260 nm όπου και φαίνεται η συγκέντρωση των νουκλεϊκών

οξέων του δείγματος η οποία υπολογίζεται από τη σχέση: $\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l})$ (Keer *et al.*, 2008).

Εφαρμογή της μεθόδου:

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 2%

1. Παρασκευάστηκε το διάλυμα TAE 1X αφού αραιώθηκε το πυκνό 50X: 20 ml σε τελικό όγκο 1 L.
2. Παρασκευή του πηκτώματος αгарόζης (2%):
 - Προετοιμάστηκε το εκμαγείο με τα χτενάκια
 - Ζυγίστηκαν 0.6 g αгарόζης και 30 ml TAE1X τα οποία και αναμείχθηκαν σε κωνική φιάλη των 100 ml.
 - Η φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να βράσει το μίγμα ενώ αναδευόταν συχνά.
 - Στο διάλυμα προστέθηκαν 4 μl EtBr και ανακινήθηκε αρκετά καλά. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε στο εκμαγείο μαζί με το χτενάκι έως ότου να πήξει.
 - Αφού στερεοποιήθηκε αφαιρέθηκε από το εκμαγείο και τοποθετήθηκε σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X αρκετό ώστε να καλύπτει το πήκτωμα.
3. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος. (Σε περίπτωση που ελέγχεται ποσότητα DNA μετά από απομόνωση αναμειγνύονται 3 μl loading buffer 2 μl DNA ενώ στην περίπτωση που ελέγχου επιτυχίας αντίδρασης PCR, αναμειγνύονται 3 μl loading buffer με 5 μl από το προϊόν της PCR).
4. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε η τάση του τροφοδοτικού περίπου στα 70V και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για ~ 40 λεπτά.
5. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

Φωτομέτρηση στα 260 nm

1. Η συσκευή φωτομέτρησης ρυθμίστηκε ώστε να φωτομετρεί στα 260 nm.
2. 2 μl από κάθε δείγματος τοποθετήθηκαν σε καθαρή κυψελίδα φωτομέτρησης μαζί με 2 μl ddH₂O και αναδεύτηκαν.

3. Η κυψελίδα τοποθετήθηκε στη συσκευή φωτομέτρησης και αφού έγινε η μέτρηση το φωτόμετρο μηδενίστηκε για το επόμενο δείγμα, αφού η κυψελίδα ξεπλύθηκε καλά με ddH₂O.

3.4 Πολλαπλασιασμός γονιδιακών τμημάτων **μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης** **(PCR – Polymerase Chain Reaction)**

Υλικά

- Γάντια
- Στατώ
- Πιπέττες ακριβείας των 2 μl, 10 μl, 20 μl, 100 μl και 200 μl
- Ακρορύγχια (αντίστοιχα για τις πιπέττες)
- Σωληνάρια Eppendorf 1.5 ml
- Φιαλίδια Eppendorf των 200 μl

Συσκευές

- Φυγόκεντρος
- Θερμικός κυκλοποιητής

Αντιδραστήρια

- Εκκινητές (Primers)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)
- Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl₂)
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10 mM το καθένα (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Taq πολυμεράση
- Αποστειρωμένο ddH₂O

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ελεγχόμενο, *in vitro* πολλαπλασιασμό (amplification) με τη βοήθεια ενζύμου, συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA από πολύ μικρές αρχικές ποσότητες δείγματος αποδίδοντας εξαιρετικά μεγάλο αριθμό αντιγράφων τα οποία μετά θα μπορούν να ανιχνεύονται μέσω διάφορων μεθόδων. Οι

αλληλουχία-στόχος εντοπίζεται από εκκινητές (ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες) μήκους -συνήθως- 15-35 bp, οι οποίοι σχεδιάζονται έτσι ώστε να είναι ομόλογοι με τις περιοχές που βρίσκονται πλευρικά από το τμήμα που θα πολλαπλασιαστεί. Είναι σημαντικό οι εκκινητές να υπάρχουν σε περίσσεια σε σχέση με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια καθώς αυτό επιταχύνει τη διαδικασία της επιμήκυνσης. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση του πολλαπλασιασμού είναι η Taq πολυμεράση η οποία προέρχεται από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus* κάτι την κάνει σταθερή στις απότομες αλλαγές των υψηλών θερμοκρασιών που απαιτούνται για την αντίδραση αυτή (Russell, 2009). Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί ένα σταθερό pH για τη βέλτιστη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα μαγνησίου βοηθούν στη πιο αποτελεσματική υβριδοποίηση των εκκινητών προσοχή όμως θα πρέπει να δοθεί γιατί ενώ χρειάζεται μια αυξημένη ποσότητα έτσι ώστε να μην υπάρχουν παραπροϊόντα στην αντίδραση, μια υπερβολική ποσότητα $MgCl_2$ εμποδίζει τη δράση της πολυμεράσης (Hoelzel, 1998). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε κύκλους (~ 30-35) και σε κάθε έναν από αυτούς το DNA-στόχος πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Ο κάθε κύκλος αποτελείται από 3 στάδια:

- i. Στάδιο αποδιάταξης (denaturation): Γίνεται θέρμανση του μίγματος στους $94^{\circ}C$ για ~1-2', έτσι ώστε να διασπαστούν οι δεσμοί υδρογόνου και να διαχωριστούν οι δυο κλώνοι. Εδώ υπάρχει ένα συμπληρωματικό στάδιο ολοκληρωτικής αποδιάταξης ($94^{\circ}C$) διάρκειας 2-3'.
- ii. Στάδιο υβριδισμού (annealing): Στο στάδιο αυτό γίνεται η σύνδεση των εκκινητών στους δύο κλώνους του DNA. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται ανάλογα με τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των εκκινητών (συνήθως $50 - 60^{\circ}C$), κάτι που υπολογίζεται από τον δείκτη T_m που είναι η θερμοκρασία υβριδισμού του 50% των μορίων του εκκινητή στο DNA. Το T_m εξαρτάται από την αναλογία βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης (GC content) και από το μήκος του εκκινητή. Γενικά, όσο μεγαλύτερο το GC content, τόσο αυξάνεται η θερμοκρασία και υπολογίζεται από τον τύπο: $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ - αφορά τον αριθμό των βάσεων του εκκινητή-.
- iii. Στάδιο επιμήκυνσης (extension): Εδώ πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων από την Taq πολυμεράση. Διαρκεί περίπου 2 λεπτά και γίνεται συνήθως στους $70 - 72^{\circ}C$, ενώ υπάρχει ένα συμπληρωματικό στάδιο τελικής επιμήκυνσης για τη πλήρη σύνθεση των μορίων στους $72^{\circ}C$ που διαρκεί συνήθως 3-5'. Στο τέλος του σταδίου

αυτού, έχουν διπλασιαστεί τα αρχικά μόρια DNA της περιοχής που επιλέχτηκε και έχει ολοκληρωθεί ένας κύκλος PCR (Mullis *et al.*, 1987)

Εφαρμογή της μεθόδου:

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό τμήματος του βρόγχου εκτόπισης D-loop ήταν οι εξής: Ovis F1 D-loop: (5'-AAC-ATA-CAA-CAC-GGA-CTT-C-3') και Ovis R2 D-loop: (5'-CTT-CAT-GTA-CTA-TGT-ACG-G-3'). Το τμήμα που πολλαπλασιάστηκε είναι περίπου 600 bp.

Η Taq πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η KAPA Taq (500 U) 5 U/μl από την KAPABIOSYSTEMS, με ρυθμιστικό διάλυμα 10X KAPA Taq Buffer B (με Mg²⁺, συγκέντρωση 1X 1.5 mM) και επιπλέον MgCl₂ (25 mM).

1. Αρχικά μεταφέρθηκε 1 μl από το κάθε δείγμα DNA σε φιαλίδια Eppendorf των 200 μl. Η ποσότητα του DNA δεν ήταν ίδια σε όλες τις περιπτώσεις καθώς μετά από την εκτίμηση της ποσότητας/ποιότητας του ολικού DNA μπορεί να χρειαστεί μεγαλύτερη ποσότητα (ακόμη και 5μl) ή λιγότερη (0.2 – 0.5 μl). Αν γίνει αυτό, ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίζεται με ddH₂O. Επίσης σε ένα από τα Eppendorf τοποθετήθηκε ddH₂O στη θέση του DNA, σαν αρνητικός μάρτυρας (negative control) ο οποίος θα δείξει αν θα έχει υπάρξει κάποια επιμόλυνση κατά ή πριν την αντίδραση.
2. Ακολούθησε η προετοιμασία του μίγματος για την αντίδραση (master mix) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) έτσι ώστε να επιτευχθούν οι τελικές συγκεντρώσεις για 50 μl μίγματος ανά δείγμα. Οι παρακάτω ποσότητες πολλαπλασιάστηκαν επί τον αριθμό των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Master mix			
	Ποσότητες	Αρχική συγκέντρωση (stock)	Τελική συγκέντρωση (σε 50 μl)
DNA*	1 μl	~ 200 - 500 ng	~ 4-10 ng
Buffer	5 μl	10X (Mg ²⁺ 15mM)	1X (Mg ²⁺ 1.5mM)
MgCl ₂	1 μl	25 mM	0.5 mM
dNTPs	1 μl	40 mM	0.8 mM
Εκκινητής Fw	1 μl	50 pmol/μl	1 pmol/μl
Εκκινητής Rv	1 μl	50 pmol/μl	1 pmol/μl
KAPA Taq	0.2 μl	5 U/μl	0.02 U/μl

ddH ₂ O	39.8 μl	–	–
--------------------	---------	---	---

Πίνακας 3: Συνθήκες αντίδρασης PCR για τον πολλαπλασιασμό του μιτοχονδριακού τμήματος D-loop.

3. Σε κάθε σωληνάριο που περιείχε το δείγμα του DNA προστέθηκαν 49 μl του μίγματος της αντίδρασης (master mix) και έγινε ανακίνηση και spin στη φυγόκεντρο.
4. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν αμέσως στο θερμικό κυκλοποιητή (καθώς το ένζυμο είναι ευαίσθητο) και οι συνθήκες στο κάθε βήμα ρυθμίστηκαν ως εξής:

Συνθήκες για ενίσχυση του μιτοχονδριακού τμήματος D-loop:

- I. Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 4 λεπτά
- II. Αποδιάταξη: 95°C για 40 δευτερόλεπτα
- III. Υβριδοποίηση: 52°C για 45 δευτερόλεπτα
- IV. Επιμήκυνση: 72°C για 45 δευτερόλεπτα
- V. Τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 λεπτά

Τα βήματα I και V πραγματοποιήθηκαν μια φορά στην συνολική αντίδραση. Τα βήματα II, III και IV πραγματοποιήθηκαν για 35 κύκλους .

5. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2) για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης. Παράλληλα ελέγχθηκε και ο αρνητικός μάρτυρας για πιθανές επιμολύνσεις.

3.5 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism)

Υλικά

- Γάντια
- Στατώ
- Πιπέττες ακριβείας των 10, 20 και 100 μl
- Ποτήρια ζέσεως των 200 και 500 ml
- Μαγνήτης ανάδευσης
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 15 και 100 ml
- Χωνί μετάγγισης

- Χαρτί διήθησης
- Σωληνάρια Eppendorf
- Γυάλινα τζαμάκια ειδικά για ηλεκτροφόρηση και χτενάκι 2mm των 15 θέσεων
- Μεταλλικό δοχείο χρώσης

Συσκευές

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (κάθετη) και τροφοδοτικό
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης (ανακινούμενη πλάκα)
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή

Αντιδραστήρια

(πήκτωμα)

- Ακρυλαμίδα (acrylamide) 99%
- Δις- ακρυλαμίδα (bisacrylamide)
- TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer 10X *
- TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99%
- APS (Ammonium persulfate) 20% w/v***
- TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer 0.5X *
- Γλυκερόλη (Glycerol) 50% w/v
- ddH₂O

(φόρτωση δειγμάτων στο πήκτωμα)

- Αποδιατακτικό διάλυμα SSCP (SSCP buffer)**

(χρώση Silver stain)

- ddH₂O
- Αιθανόλη (EtOH absolute) 100%
- Οξικό οξύ (Acetic acid) 99%
- Νιτρικός άργυρος (AgNO₃)

- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)
- Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄)
- Φορμαλδεϋδη (Folmaldehyde) 37%

* TBE 10X (2L): 216 g Tris Base (0.89M)
110 g Boric Acid (0.89M)
16.6 g EDTA
ddH₂O έως τα 2L τελικό όγκο

TBE 0.5X (1L): 0.5ml TBE 10X
ddH₂O έως τα 1L τελικό όγκο

** SSCP buffer: Formamide 95%
Bromophenol blue 0.05%
Xylene Cyanol 0.05%
NaOH 10 mM

*** APS 20%: 2 g Ammonium persulfate
ddH₂O έως τα 10 ml τελικό όγκο

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη διαφορετική κινητικότητα που έχουν αποδιαταγμένα προϊόντα PCR σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα που επιβραδύνουν την κίνηση του DNA. Αυτό την κάνει μια από τις καλύτερες μεθόδους ανίχνευσης SNPs με εύκολη εφαρμογή. Οι μονόκλωνες αλυσίδες των αποδιαταγμένων προϊόντων σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές όταν τοποθετούνται στο πήκτωμα και αυτές οι δομές είναι μοναδικές για τις διαφορετικές αλληλουχίες, οι οποίες αν διαφέρουν έστω και σε μια βάση αλλάζει η αναλογία μεγέθους-φορτίου που οδηγεί σε διαφορετική κινητικότητα και έχουν 70-90% πιθανότητα να εντοπιστούν μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Τα ίδια τμήματα θα κινηθούν με τον ίδιο τρόπο και στην ίδια απόσταση στο πήκτωμα και όσα δείγματα είναι ίδια θα εμφανίσουν δύο όμοιες μπάντες (για τους δυο κλώνους). Η τεχνική αποτελείται από 3 στάδια: την αποδιάταξη των PCR προϊόντων, την ηλεκτροφόρηση των αποδιαταγμένων μορίων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και τέλος τη χρώση του πηκτώματος για τον εντοπισμό των μπαντών. Υπάρχουν 4 παράμετροι που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της μεθόδου: Το μήκος του προϊόντος της PCR, η θερμοκρασία ηλεκτροφόρησης, η μέθοδος αποδιάταξης και η πυκνότητα του πηκτώματος. Τα τμήματα που θα ηλεκτροφορηθούν θα πρέπει να είναι ιδανικά ~ 150-200 bp σε μήκος. Αν είναι μικρότερα δεν θα πάρουν κάποια διαμόρφωση καθώς θα είναι λίγες οι πιθανότητες να βρεθεί μια τετράδα νουκλεοτιδίων έτσι ώστε να υβριδιστούν (1

πιθανότητα στις 256 βάσεις περίπου). Από την άλλη σε μεγαλύτερα τμήματα (> 200 bp), αλλαγή μιας βάσης δεν θα επηρεάσει τη δομή του προϊόντος και έτσι δεν θα εντοπιστούν τα SNPs. Επίσης, η τάση του ρεύματος δε θα πρέπει να ξεπερνάει τα 5 V/cm σε 20-25°C, αν και η γλυκερόλη προστατεύει το πήκτωμα από θερμοκρασία που αυξάνεται αυξάνοντας την τάση (Kalvatchev *et al.*, 2005). Στη φάση της χρώσης, ο νιτρικός άργυρος αντιδρά με τη φορμαλδεΰδη και παρουσία βάσης φαίνονται οι μπάντες καθώς παίρνουν ένα καφέ χρώμα (Shambrook *et al.*, 2000).

Εφαρμογή της μεθόδου:

Αρχικά ετοιμάστηκε το πήκτωμα με συγκέντρωση 10%:

1. Έγινε η τοποθέτηση των ειδικών τζαμιών για την ηλεκτροφόρηση και προετοιμασία της συσκευής του πηκτώματος.
2. Σε ποτήρι ζέσεως με μαγνήτη αναδεύτηκαν τα υλικά για την παρασκευή του πηκτώματος:
 - 6.187 g ακρυλαμίδα
 - 0.165 g δις-ακρυλαμίδα
 - 6 ml γλυκερόλη 50%
 - 5 ml TBE 10X
 - ddH₂O έως τα 50 ml
3. Αφού ομογενοποιήθηκε, έγινε φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί σε ογκομετρικό κύλινδρο με προσοχή και συμπληρώθηκε με ddH₂O έως τα 62.5 ml.
4. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη και προστέθηκαν τα TEMED και APS ενώ αναδεύτηκαν και αμέσως το διάλυμα μεταφέρθηκε στη συσκευή (τα δυο τελευταία αντιδραστήρια πολυμερίζουν την ακρυλαμίδα). Τέλος τοποθετήθηκαν τα χτενάκια.
5. Αφού έπηξε (μετά από ~ 45'), αφαιρέθηκαν με προσοχή τα χτενάκια και τα πηγαδάκια καθαρίστηκαν.
6. Προστέθηκε το διάλυμα 0.5X TBE στη συσκευή έτσι ώστε να καλύπτει το πήκτωμα.

Ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων (αποδιάταξη):

1. 5-7 μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την εκτίμηση που έγινε από την ηλεκτροφόρηση) μεταφέρονται σε σωληνάρια Eppendorf και προστίθεται αποδιατακτικό διάλυμα SSCP 10 μl.
2. Τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή αλλά η διαδικασία σταματάει στο σημείο της αποδιάταξης (εδώ 99.1°C, 1:30' πριν τελειώσει αυτός ο κύκλος) και μεταφέρονται αμέσως σε πάγο (για να αποφευχθεί η επαναδιάταξη).
3. Τα δείγματα τοποθετούνται με πιπέττα στα πηγαδάκια του πηκτώματος.
4. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 220V για ~20 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί η χρώση του πηκτώματος με Silver staining:

1. Προετοιμασία διαλύματος Silver Stain (400 ml) σε ογκομετρικό

- 10 ml EtOH
- 0.5 ml Acetic acid
- ddH₂O έως 400 ml

Το πήκτωμα εμβαπτίστηκε σε 200 ml του πηκτώματος αναδεύτηκε για 3' στον αναδευτήρα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με τα υπόλοιπα 200 ml και ακολούθησε πλήση με ddH₂O για 1 λεπτό υπό ανάδευση.

2. Προετοιμασία διαλύματος νιτρικού αργύρου σε ογκομετρικό

- 1 L ddH₂O
- 1 g νιτρικού αργύρου

Τα παραπάνω τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα με μαγνήτη και αφού ομογενοποιήθηκε το μίγμα, εμβαπτίστηκε το πήκτωμα σε 200 ml της χρώσης για περίπου 10-15 λεπτά. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με ddH₂O, διάρκειας 1 λεπτού η κάθε μια ενώ το πήκτωμα ήταν υπό ανάδευση.

3. Προετοιμασία τελικού διαλύματος χρώσης SSCP σε ποτήρι:

- 200 ml ddH₂O
- 3g καυστικό νάτριο
- ελάχιστο NaBH₄ 50 μM
- 1 ml φορμαλδεΰδη

Τα παραπάνω αναμιγνύονται και το πήκτωμα εμβαπτίζεται υπό ανάδευση έως ότου να πάρει ένα κιτρινωπό χρώμα και οι μπάντες να φανούν με σκούρο καφέ χρώμα και ακολουθεί πλήση με ddH₂O.

4. Τέλος το πήκτωμα στέγνωσε και με προσοχή τυλίχτηκε σε διάφανο σακουλάκι.

3.6 Καθαρισμός προϊόντων PCR (kit: Nucleospin^R Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey-Nagel)

Υλικά

- Γάντια
- Στατώ
- Πιπέττες ακριβείας των 10, 20, 100 και 100 μl
- Ακρορύγχια αντίστοιχα για τις πιπέττες
- Σωληνάρια Eppendorf 1.5 ml
- Στήλες Nucleospin Extract II

Συσκευές

- Φυγόκεντρος
- Vortex

Αντιδραστήρια

- NTI Buffer (έτοιμο στο kit)
- NT3 Buffer (έτοιμο στο kit)
- NE Buffer (έτοιμο στο kit)
- Αιθανόλη
- ddH₂O

Αρχή της μεθόδου:

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητος πριν από την αλληλούχιση καθώς πρέπει να μην υπάρχουν παραπροϊόντα, διμερή εκκινητών από τη μη ειδική υβριδοποίηση και άλλες προσμίξεις από την

αντίδραση PCR (Hoelzel, 1998). Το DNA προσδένεται σε μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου (που υπάρχει στις ειδικές στήλες). Αυτό γίνεται παρουσία χαοτροπικού άλατος που προστίθεται μέσω ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης. Οι προσμίξεις απομακρύνονται με αιθανολικό διάλυμα και το καθαρό DNA εκλύεται με τη βοήθεια ενός ελαφρώς αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει Tris/HCl.

Εφαρμογή της μεθόδου:

1. Αναμίχθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf 1.5 ml 1 όγκου από το δείγματα με 2 όγκους διαλύματος NT1.
2. Μεταφέρθηκαν σε στήλες NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε σωληνάρια συλλογής (2ml).
3. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 30 sec.
4. Προστέθηκαν 700 µl Buffer NT3 και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 30 sec. Έγινε επανάληψη αυτού του βήματος.
5. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1' και οι στήλες τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Eppendorf των 1.5 ml.
6. Προστέθηκαν 17 µl Buffer NE και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1'.
7. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1'.

3.7 Αλληλούχιση προϊόντων PCR

Μετά τον καθαρισμό τα δείγματα (~30-40 µl) στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρία CeMIA. Η παραλαβή των αποτελεσμάτων (χρωματογραφήμάτων) έγινε μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου.

3.8 Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (MSA – Multiple Sequence Alignment) και δημιουργία φυλογενετικού δέντρου

Η αλληλούχιση στις φυλογενετικές αναλύσεις δίνει ένα μεγάλο πλεονέκτημα σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους, καθώς η κάθε θέση στην αλληλουχία μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ξεχωριστός χαρακτήρας. Συγκρίνοντας λοιπόν το κατά πόσο

μοιάζουν ή διαφέρουν δύο αλληλουχίες μπορούμε να καταλήξουμε για τις φυλογενετικές τους σχέσεις με αρκετά μεγάλη λεπτομέρεια. Η σύγκριση γίνεται με στοίχιση των αλληλουχιών: κάθε αλληλουχία αντιστοιχεί σε μια σειρά μιας μήτρας και οι ομόλογες θέσεις των διαφορετικών αλληλουχιών ευθυγραμμίζονται σε στήλες (Barton *et al.*, 2007).

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθηκαν για το αναμενόμενο μήκος και την ομολογία τους (με το είδος και τον γενετικό τόπο) μέσω του διαδικτυακού προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Tool), έναν ευρετικό αλγόριθμο ο οποίος κάνει μια γρήγορη αναζήτηση στη βάση αλληλουχιών του National Centre for Biotechnology Information (NCBI), ψάχνοντας για ολιγονουκλεοτίδια από την αλληλουχία που δόθηκε και προσθέτοντας σταδιακά βάσεις βρίσκει αυτές με την μεγαλύτερη ομολογία (Altschul *et al.*, 1997). Τα αποτελέσματα του χρωματογραφήματος ελέγχθηκαν και διορθώθηκαν τυχόν βάσεις που δεν ερμηνεύτηκαν σωστά μέσω του προγράμματος BioEdit (v. 5.0.9)

Ο προσδιορισμός της φυλογένεσης και η εξαγωγή ενός φυλογενετικού, δεν είναι απλή διαδικασία καθώς βασικό ρόλο παίζουν οι πιθανότητες και δεν υπάρχει κάτι που εγγυάται την αντικειμενικότητα του δέντρου. Γενικότερα βασιζόμενες στο είδος των δεδομένων χωρίζονται σε αυτές που δημιουργούν ένα φυλογενετικό δέντρο, που στηρίζονται σε καταστάσεις διακριτών χαρακτήρων (discrete character states) και σε αυτές υπολογίζουν τις αποστάσεις των μητρών (distance matrix). Ενώ με βάση των αλγορίθμων τους σε αυτές που χρησιμοποιούν ένα μόνο αλγόριθμο ομαδοποίησης (clustering algorithm) ή αυτές που στηρίζονται σε κάποιο κριτήριο αξιολόγησης (optimality criterion) (Lemey *et al.*, 2009).

Στη συγκεκριμένη ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA (v.5.2) ώστε να βρεθούν οι διαπληθυσμιακές αποστάσεις βάσει του μοντέλου Maximum Composite Likelihood (MCL) όπου οι αντικαταστάσεις που υπολογίζει είναι οι μεταπτώσεις και οι μεταστροφές. Δεν υπολογίζει τα κενά και οι αντικαταστάσεις θεωρούνται ομογενείς με σταθερό ρυθμό ανάμεσα στις γενεαλογίες στα διάφορα τμήματα. Για τη δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος σύνδεσης γειτόνων (Neighbor-joining). Με αυτή τη μέθοδο κατασκευάζεται το δέντρο με διαδοχική εύρεση γειτόνων (έχει μια αστεροειδή μορφή) οι οποίοι

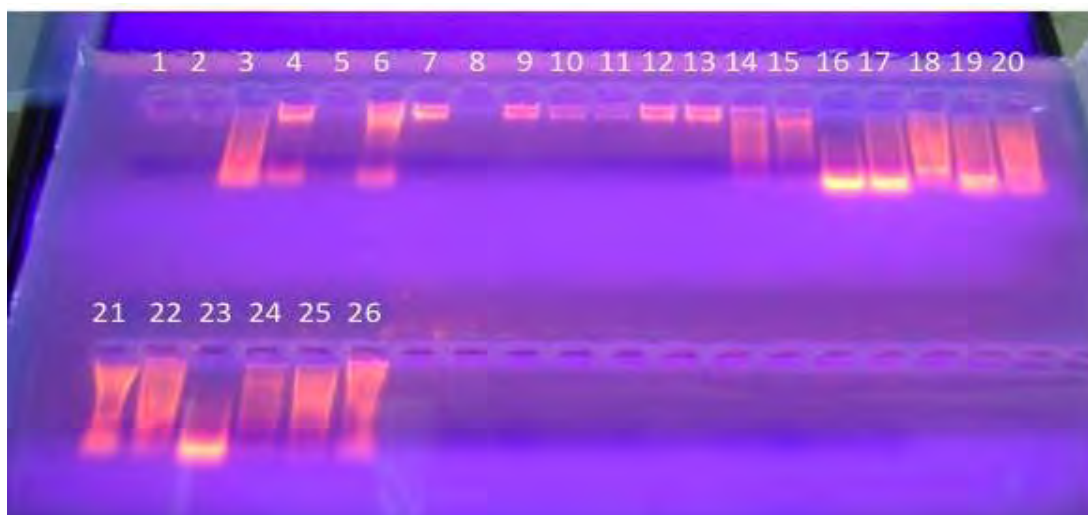
συνδέονται με ένα εσωτερικό κόμβο ελαχιστοποιώντας έτσι το μήκος του δέντρου. Ουσιαστικά ξεκινώντας από ένα δέντρο βασισμένο στις πιο εμφανείς ομοιότητες, καταλήγει σε ένα δέντρο με τους πιο πιθανούς τοπολογικούς συνδιασμούς. Με την προσθήκη της παραμέτρου για bootstrap (εδώ έγινε bootstrapt 100) -που ελέγχει τις πιθανότητες ένα αποτέλεσμα να υπάρχει από τύχη- θεωρείται η καλύτερη μέθοδος και είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη (Nei *et al.*,1998).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. 1 Απομονώσεις

Οι απομονώσεις αποδείχτηκαν αρκετά αποτελεσματικές και με τις δύο μεθόδους (διάλυμα SSC, κιτ με μεμβράνες πυριτίου της Life technologies) σε 289 δείγματα από αίμα, γάλα και ιστό προβάτων. Ένας μικρός αριθμός ωστόσο δεν έδωσε αρκετό γενετικό υλικό.

Ενδεικτικά στη παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από απομόνωση ολικού DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα αγαρόζης 2%. Τα συγκεκριμένα δείγματα προέρχονται από γάλα άτομων της φυλής Φριζάρτα (Άρτα) και η απομόνωση έγινε με kit:



Εικόνα 3: Ποιοτικός έλεγχος μετά από απομόνωση 26 δειγμάτων. Για 22 από τα δείγματα αυτά η απομόνωση είχε επιτυχία, ενώ τα 16 (3,4,6,7,14,15, 16,17, 18,19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) από αυτά έδωσαν ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα (αρκετά μεγάλη ποσότητα DNA).

4.2 Εκτίμηση επιτυχίας αντίδρασης PCR

Μετά την ολοκλήρωση της κάθε αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του τμήματος της D-loop, ο έλεγχος της επιτυχίας της γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Πολλά από τα δείγματα δεν ενισχύθηκαν και έτσι δοκιμάστηκαν και άλλες ποσότητες DNA (εκτός του 1 μ l): 0.2, 0.5, 0.8, 2, 3, 5 ακόμη και 8 μ l. Τελικά τα περισσότερα δείγματα ενισχύθηκαν επιτυχώς στην περιοχή της D-loop, και οι φυλές με τα καλύτερα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση με SSCP. Η ποιότητα και αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης που ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση, καθορίζεται αρχικά από την παρουσία ζωνών συγκεκριμένου μεγέθους το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της D-loop, καθώς και από την καθαρότητα και τη φωτεινότητα των ζωνών του ενισχυμένου τμήματος.

Ενδεικτικά στη παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση ατόμων από τη φυλή της ορεινής Ηπείρου (Μπούτσικη).

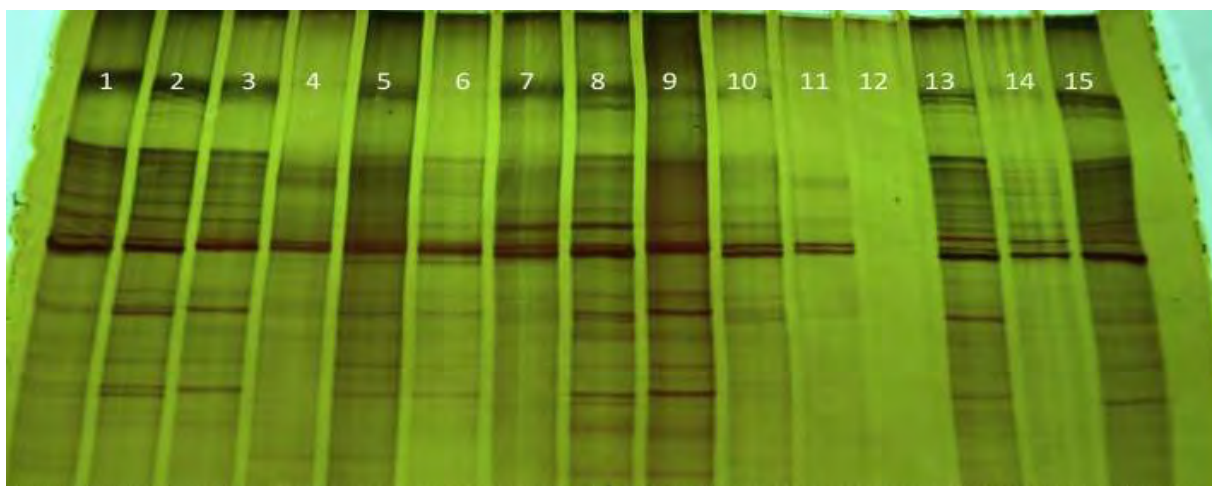


Εικόνα 4: Ποιοτικός έλεγχος μετά από αντίδραση PCR 20 δειγμάτων για την περιοχή της D-loop σε πήκτωμα αγαρόζης 2% από άτομα της φυλής της ορεινής Ηπείρου (Μπούτσικη). Τα δείγματα 1, 2, 3, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 έδωσαν ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα.

4.3 Ανάλυση μέσω πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP)

Μετά τον έλεγχο του επιτυχούς πολλαπλασιασμού της περιοχής D-loop για αρκετά από τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση SSCP για τα PCR προϊόντα, πριν γίνει αλληλούχηση καθώς μπορεί να ξεχωρίσει όπως έχει ήδη αναφερθεί, τμήματα DNA που διαφέρουν ακόμη και σε μια βάση. Ελαττώνει επίσης το κόστος της πειραματικής διαδικασίας καθώς μειώνεται ο αριθμός δειγμάτων προς αλληλούχηση.

Ωστόσο μετά την ανάλυση που έγινε στα συγκεκριμένα δείγματα δεν μπόρεσαν να διαχωριστούν οι φυλές. Ενδεικτικά στη παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από ανάλυση SSCP για άτομα της φυλής Φριζάρτα, όπου από τις δύο κύριες κεντρικές ζώνες συμπεραίνουμε ότι υπάρχει κάποιο πρότυπο στη φυλή αυτή με κάποια άτομα που διαφέρουν στα αλληλόμορφά τους (13, 14, 14). Οι υπόλοιπες φυλές έδωσαν αρκετά περίπλοκα πρότυπα με αποτέλεσμα να μη μπορεί να γίνει διαχωρισμός φυλών μέσω της μεθόδου αυτής.

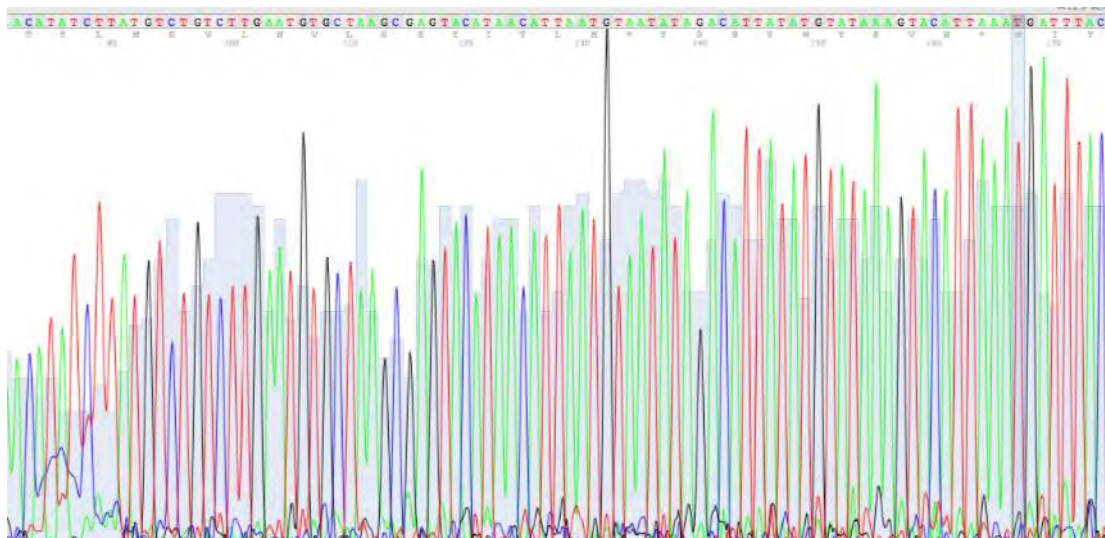


Εικόνα 5: Ανάλυση SSCP σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% για 15 άτομα *Ovis aries* της φυλής Φριζάρτα. Αποτελέσματα από τις υπόλοιπες φυλές έδειξαν ότι με αυτή τη μέθοδο δεν διαχωρίζονται ικανοποιητικά οι διαφορετικές φυλές.

4.4 Αλληλούχιση, διορθώσεις και στοίχιση

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών για την περιοχή της D-loop έγινε για 96 άτομα (5 από κάθε φυλή, εκτός από τις φυλές της Άρτας και της Ορεινής Ηπείρου για τις αλληλουχήθηκαν περισσότερα άτομα) και βασίστηκε στον ένα εκκινητή (Forward 1), δίνοντας αλληλουχίες με μήκη περίπου 500bp.

Σε κάθε ένα από τα χρωματογραφήματα έγινε προσεκτικός έλεγχος προκειμένου να διορθωθούν τα λάθη (Εικόνα 6) ενώ η αρχή και το τέλος χρωματογραφημάτων με κακή ευκρίνεια αφαιρέθηκαν, δίνοντας αλληλουχίες με λίγο διαφορετικά μήκη τα οποία τελικά προσαρμόστηκαν. Τέλος, μερικά δείγματα αποκλείστηκαν καταλήγοντας σε 91 δείγματα (αλληλουχίες) από 14 φυλές (Σκόπελος, Θράκη, Άργος, Χίος, Άρτα, Ορεινή Ηπείρου, Καραμάνικη, Πηλίου, Κατσικά, Φλώρινας, Ζακύνθου, Κύμης και Σαρακατσάνικη) τελικού μήκους 421bp.



Εικόνα 6: Παράδειγμα χρωματογραφήματος αλληλούχισης. Οι βάσεις αναγράφονται στη μπάρα που βρίσκεται στο επάνω τμήμα και πρέπει να αντιστοιχούν στην βάση που δημιουργεί την ψηλότερη καμπύλη ακριβώς από κάτω τους. Σε αντίθετη περίπτωση οι βάσεις πρέπει να διορθώνονται.

Αφού έγινε η διόρθωση για κάθε ένα από τα δείγματα, οι αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν μέσω BLAST και βρέθηκαν ταυτόσημες με το γενετικό τόπο της D-loop, άτομων του είδους *Ovis aries* (Εικόνα 7).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GeoBasis Graphical Distance type of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate BAI244 D-loop, partial sequence; mitochondrial	785	2432	100%	0.0	100%	FJ545893.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate z16 D-loop, partial sequence; mitochondrial	785	2432	100%	0.0	100%	EF600915.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries clone volp30 D-loop, partial sequence; mitochondrial	785	2432	100%	0.0	100%	DQ242444.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries clone CAUC35 D-loop, partial sequence; mitochondrial	785	2432	100%	0.0	100%	DQ242095.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate SAR61 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2443	100%	0.0	99%	FJ546052.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate TAM287 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2443	100%	0.0	99%	FJ546022.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate TAM286 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2443	100%	0.0	99%	FJ546021.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate SAR110 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2443	100%	0.0	99%	FJ545995.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate SAR108 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2443	100%	0.0	99%	FJ545993.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate KHO322 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2426	100%	0.0	99%	FJ545973.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate KHO321 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2426	100%	0.0	99%	FJ545972.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate GOB228 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2443	100%	0.0	99%	FJ545955.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate GOB226 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2443	100%	0.0	99%	FJ545953.1
<input type="checkbox"/> Ovis aries isolate STH17 D-loop, partial sequence; mitochondrial	780	2426	100%	0.0	99%	FJ545875.1

Εικόνα 7: Αποτελέσματα από την ταυτοποίηση των αλληλουχιών Η ταυτοποίηση είδους και γενετικού τόπου έγινε με το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του NCBI.

Ακολούθησε η στοίχιση των αλληλουχιών για τις περίπου 500bp, μέσω του προγράμματος MEGA (Εικόνα 8) και τα αποτελέσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου και τη μετέπειτα ανάλυση.



Εικόνα 8: Παράδειγμα στοίχισης αλληλουχιών.

4.5 Φυλογενετική ανάλυση και δημιουργία φυλογενετικού δέντρου

Οι τελικές αλληλουχίες μετά τη διόρθωση, ταυτοποίηση και στοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν για το υπολογισμό των καθαρών διαπληθυσμιακών αποστάσεων μέσω του προγράμματος MEGA βάσει του μοντέλου Maximum Composite Likelihood (MCL) το οποίο βασίζεται στις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ατόμων. Στο συγκεκριμένο μοντέλο οι αντικαταστάσεις που υπολογίστηκαν ήταν οι μεταπτώσεις και οι μεταστροφές. Θεωρείται ότι υπάρχει ένα ομοιόμορφο πρότυπο υποκαταστάσεων ανάμεσα στα διάφορα τμήματα και οι αντικαταστάσεις ανάμεσα στις γενεαλογίες στα διάφορα τμήματα θεωρείται πως προκύπτουν με σταθερό ρυθμό.

Τα αποτελέσματα των διαπληθυσμιακών γενετικών αποστάσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) όπου σε γενικές γραμμές οι αποστάσεις κυμαίνονται από 0,000 που είναι η μικρότερη έως και 0,039 που είναι η μεγαλύτερη. Ανάμεσα στις ίδιες φυλές οι αποστάσεις είναι μηδενικές ενώ τις μεγαλύτερες αποστάσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες φυλές έχουν οι νησιώτικες (Σκόπελος, Χίος) καθώς και η Κατσικά. Οι αποστάσεις τους κυμαίνονται από 0,039 έως και 0,027 για τη Σκόπελο, 0,024 για τη Χίο και 0,029 για την Κατσικά, με την τελευταία να φαίνεται ως η πιο διαφοροποιημένη μαζί με της Σκοπέλου. Η αμέσως επόμενη φυλή που ξεχωρίζει είναι της Ορεινής Ηπείρου (Μπούτσικη) με αποστάσεις από 0,036 έως και 0,023 ενώ ο μέσος όρος είναι γύρω στο 0,025. Οι υπόλοιπες φυλές μοιάζουν να

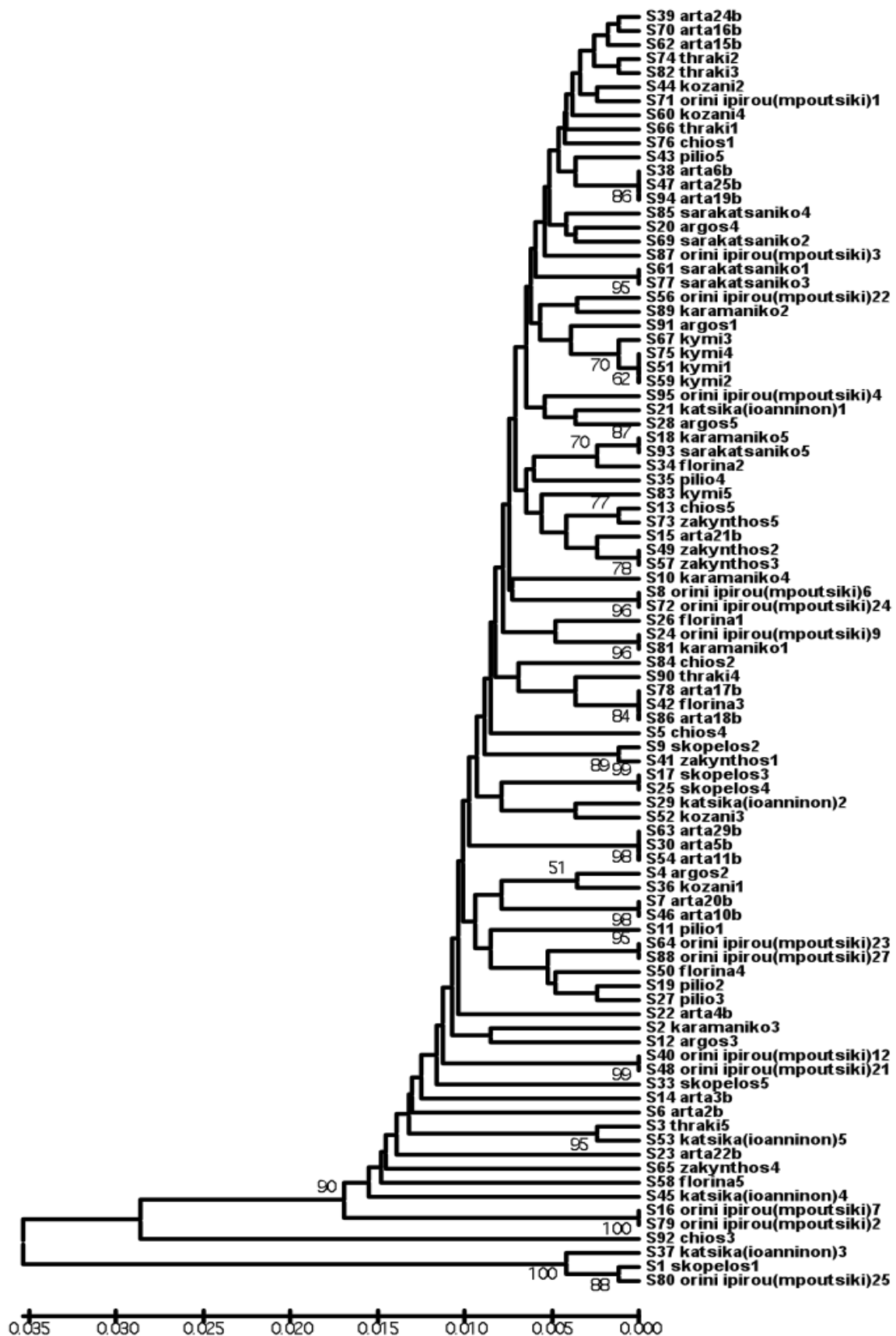
έχουν περίπου το ίδιο επίπεδο διαφοροποίησης, με ένα μέσο όρο αποστάσεων 0,020.

	Σκόπελος	Θράκη	Άργος	Χίος	Άρτα	Ορεινή Ήπειρος (Μπούτσικα)	Καραμάνικα	Πήλιο	Κατσικά	Φλώρινα	Κοζάνη	Ζάκυνθος	Κύμη	Σαρακατσάνικα
Σκόπελος	0,000													
Θράκη	0,030													
Άργος	0,030	0,017												
Χίος	0,035	0,025	0,025											
Άρτα	0,030	0,018	0,018	0,026										
Ορεινή Ήπειρος	0,035	0,024	0,023	0,031	0,025									
Καραμάνικα	0,030	0,019	0,019	0,025	0,020	0,025								
Πήλιο	0,030	0,018	0,018	0,026	0,020	0,024	0,021							
Κατσικά	0,039	0,031	0,031	0,039	0,033	0,036	0,033	0,032						
Φλώρινα	0,030	0,019	0,020	0,026	0,020	0,027	0,020	0,021	0,033					
Κοζάνη	0,030	0,016	0,016	0,026	0,018	0,024	0,020	0,017	0,030	0,020				
Ζάκυνθος	0,030	0,019	0,019	0,024	0,019	0,025	0,019	0,020	0,032	0,020	0,020			
Κύμη	0,027	0,015	0,015	0,024	0,018	0,023	0,016	0,017	0,029	0,019	0,016	0,017		
Σαρακατσάνικα	0,028	0,016	0,016	0,024	0,017	0,024	0,016	0,019	0,030	0,018	0,017	0,018	0,015	0,000

Πίνακας 4: Διαπληθυσμιακές γενετικές αποστάσεις μεταξύ των 14 φυλών που ελέγχθηκαν. Η μεγαλύτερη απόσταση έχει σημειωθεί με έντονη γραφή.

Ακολούθησε η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου βάσει της μεθόδου Neighbour-Joining (NJ) μέσω του προγράμματος MEGA, με 1000 bootstrapt για τον έλεγχο της αξιοπιστίας του. Το δέντρο παρουσιάζεται στην Εικόνα 9 και οι τιμές bootstrapt (%) που είναι κάτω από 50% δεν αναγράφονται. Από την ανάγνωση του δέντρου, προκύπτει ότι τα διάφορα άτομα, με μερικές εξαιρέσεις, δεν ομαδοποιούνται ανάλογα με τη φυλή από την οποία προέρχονται. Αντιθέτως, η ομαδοποίηση γίνεται

τυχαία. Τέσσερα από τα πέντε άτομα που αναλύθηκαν από τη φυλή της Κύμης φαίνεται να κατηγοριοποιούνται μαζί και μάλιστα με bootstrap πάνω από 50%, υποδηλώνοντας αξιόπιστα στοιχεία.



Εικόνα 9: Φυλογενετικό δέντρο για τα 91 άτομα που μελετήθηκαν, το οποίο κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα MEGA βασισμένο σε μέθοδο Neighbour-Joining (NJ) με bootstrap 1000.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες σε είδη από τα πρωτεύοντα (Mishmar *et al.*, 2006) και άλλα θηλαστικά (Fonseca *et al.*, 2008) έως τα ασπόνδυλα (Gagnsire *et al.*, 2012) και τα έντομα (Porcell *et al.*, 2007) παρουσιάζουν στοιχεία που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τη μεγάλη ποικιλότητα μιτοχονδριακών γονιδίων ως προσαρμογή στο μεγάλο εύρος περιβαλλόντων που εξαπλώνονται οι ζωικοί οργανισμοί. Η έκθεση στην ποικιλία των εξωτερικών ερεθισμάτων, ασκεί εξελικτικές πιέσεις στα γονίδια της ΟΧΡΗΟΣ, που αντιδρούν σχετικά γρήγορα λόγω του υψηλού ρυθμού μεταλλάξεων του mtDNA και πιθανόν να πυροδοτούν μια αύξηση στο ρυθμό μεταλλάξεων και του πυρηνικού. Αξιολόγηση αυτών των εξελικτικών πιέσεων στα μιτοχονδριακά γονίδια μπορεί να δώσει στοιχεία για την προσαρμοστική εξέλιξη τους (Fonseca *et al.*, 2008) καθώς και την επιρροή που έχουν στα πυρηνικά γονίδια που εμπλέκονται στην ΟΧΡΗΟΣ μέσω της συνεργασίας τους.

Μεταλλάξεις που καταλήγουν σε αμινοξικές αλλαγές στο mtDNA, πιθανόν να καλυτερεύουν την ικανότητα της αναπνοής, βοηθώντας στην προσαρμογή σε νέα περιβάλλοντα και έρευνες συσχετίζουν την ποικιλία των γονιδίων της ΟΧΡΗΟΣ με γεωγραφικά ξεχωριστές γενεαλογίες (Fonseca *et al.*, 2008, Mishmar *et al.*, 2006). Ακόμη, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την αύξηση του ρυθμού εξέλιξης και τη θετική επιλογή στα πυρηνικά γονίδια που συνεργάζονται με τα μιτοχονδριακά στη συναρμολόγηση του ΟΧΡΗΟΣ: Έχουν εντοπιστεί αλλαγές οι οποίες σχετίζονται με την αλληλεπίδραση των δυο γονιδιωμάτων (Hudson *et al.*, 2005, Mishmar *et al.*, 2006), κάτι που υποστηρίζεται εν μέρη και από την εμφάνιση θανατηφόρων ασθενειών οφειλόμενων σε δυσλειτουργία των γονιδίων του ΟΧΡΗΟΣ λόγω ασυμβατότητας των δύο γονιδιωμάτων (Mishmar *et al.*, 2006). Συνεπώς η απομόνωση πληθυσμών σε πολύ διαφορετικά περιβάλλοντα και για αρκετά μεγάλα χρονικά διαστήματα μπορεί να οδηγήσει σε αναπαραγωγικούς φραγμούς με άλλους πληθυσμούς, μέσω της προσαρμογής των μεταβολικών προτύπων τους, εμπλέκοντας τα μιτοχόνδρια στην εξέλιξη.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με στόχο τον διαχωρισμό διαφορετικών ελληνικών φυλών του προβάτου (*Ovis aries*) που πιθανόν να αποτελούν αρχή ενδοειδικού διαχωρισμού και τελικά ειδογένεσ

Μέσω των απομονώσεων λήφθηκαν ικανοποιητικές ποσότητες γενετικού υλικού που χρησιμοποιήθηκαν για τον επίσης επιτυχή πολλαπλασιασμό της μιτοχονδριακής περιοχής D-loop. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε μέσω των ηλεκτοφορήσεων που έδωσαν ευδιάκριτες ζώνες το μέγεθος των οποίων συμφωνούσε με τα ήδη γνωστά για τη D-loop.

Η τεχνική SSCP δεν έδωσε κάποια πρότυπα που διαχωρίζουν τις φυλές. Ενώ οι ζωνώσεις ήταν ευδιάκριτες, τα αλληλόμορφα έδειχναν να είναι όμοια σε όλες τις φυλές με εξαιρέσεις κάποιων ατόμων που όμως δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την διεξαγωγή κάποιου προτύπου, καθώς ήταν ελάχιστα και εντοπίζονταν σε διάφορες φυλές. Τα αποτελέσματα των SSCP ίσως επιβεβαιώνεται εν μέρει από αυτά του φυλογενετικού δέντρου στο οποίο τα άτομα δεν ομαδοποιούνται σύμφωνα με τις φυλές τους, αλλά η ομαδοποίηση γίνεται τυχαία. Επίσης, είναι πιθανό η μέθοδος αυτή να μην είναι κατάλληλη για το τμήμα που ενισχύθηκε καθώς ενδείκνυται για τμήματα που ιδανικά έχουν μήκος 150-200bp, ενώ στην προκειμένη περίπτωση το τμήμα ήταν 600 bp. Τα SNPs σε μεγάλα τμήματα όπως η περιοχή της D-loop δεν θα επηρεάσουν απαραίτητα την κινητικότητα των αποδιαταγμένων κλώνων (Kalvatchev *et al.*, 2005). Επειδή όμως έχει βρεθεί ότι με χαμηλότερο pH αυξάνει η ευαισθησία της μεθόδου για αρκετά μεγάλα τμήματα (800bp) (Kukita *et al.*, 1997) θα μπορούσε μελλοντικά να επαναληφθεί η διαδικασία χρησιμοποιώντας ένα ρυθμιστικό διάλυμα με χαμηλότερο pH ή διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (αυξημένη συγκέντρωση γλυκερόλης χαμηλώνει το pH του ρυθμιστικού διαλύματος).

Ο γενετικός μιτοχονδριακός τόπος που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης εδώ, η μη μεταφραζόμενη περιοχή D-loop, έχει δύο υπερμετάβλητες επικράτειες (domains) στις οποίες συμβαίνουν πολλές αντικαταστάσεις, ενθέσεις και εξαλείψεις. Το τελευταίο, ενώ θεωρητικά είναι πρακτικό για ενδοειδικές μελέτες, ίσως να δυσκολεύει τη φυλογένεση καθώς η τόσο μεγάλη μεταβλητότητα οδηγεί στην εξαφάνιση απλοτύπων που αντιπροσώπευαν ενδιάμεσα εξελικτικά στάδια, αποτυπώνοντας μόνο την τωρινή κατάσταση (Wan *et al.*, 2004). Οι συνεχόμενες διάφορες επαναλήψεις (variable number tandem repeats) που υπάρχουν στα άκρα της περιοχής της D-loop και έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για να μελετήσουν απλοτύπους προβάτων (Hiendleder *et al.*, 1998), θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν σαν ξεχωριστό τμήμα για σύγκριση.

Οι διαπληθυσμιακές αποκλίσεις βρέθηκαν αρκετά αυξημένες για τα άτομα της Σκοπέλου, Κατσικά και Χίου καθώς είχαν τις μεγαλύτερες αποστάσεις (τιμές > 0,030),

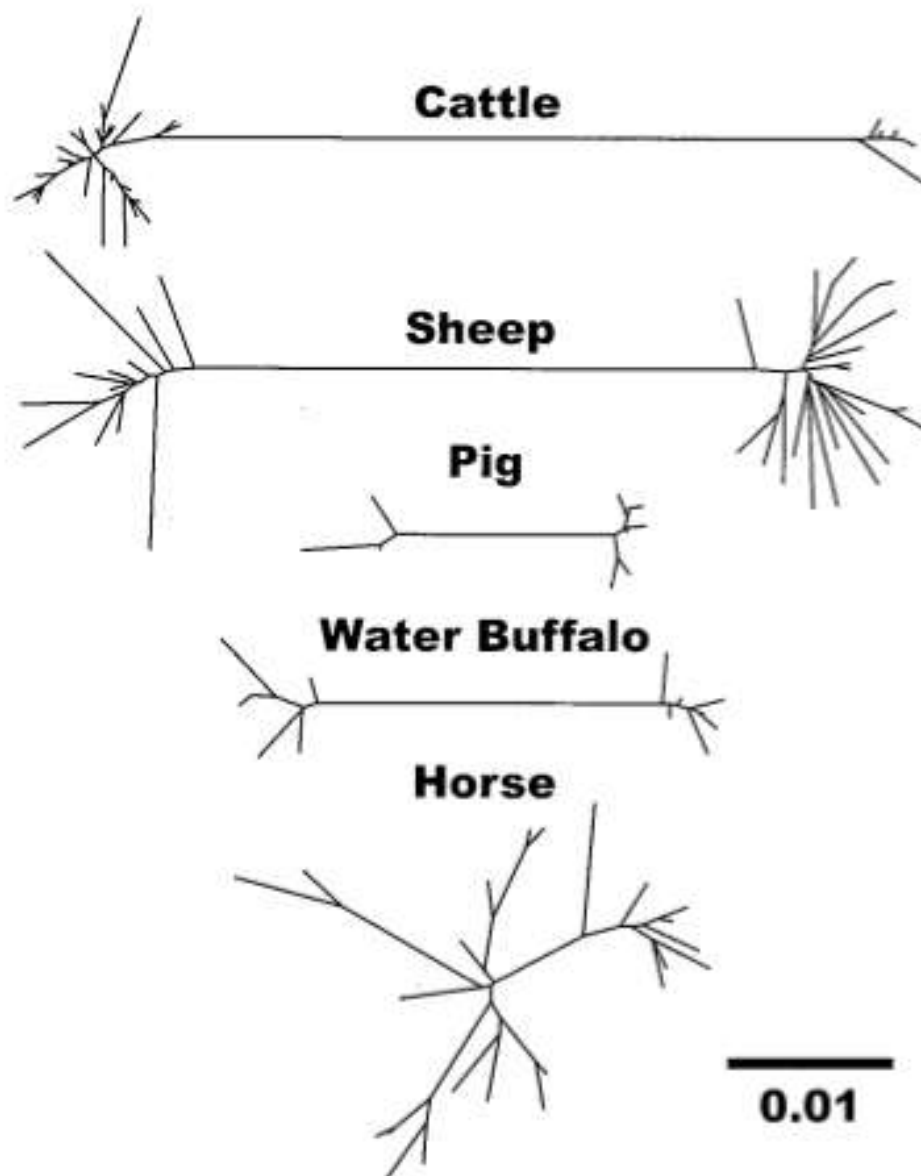
όπως και η φυλή της Ορεινής Ηπείρου (Μπούτσικη) ενώ οι υπόλοιπες 10 φυλές (Θράκης, Σαρακατσάνικη, Κοζάνης, Φλώρινας, Άρτας, Ζακύνθου, Πηλίου, Κύμης, Άργους και Καραμάνικη) είχαν γενικά αποκλίσεις με μέσο όρο 0,020. Αυτό δείχνει ότι οι δύο νησιώτικοι πληθυσμοί (Σκόπελος, Χίος) είναι γεωγραφικά απομονωμένοι περισσότερο από τους υπόλοιπους με αποτέλεσμα να είναι πιο απομακρυσμένοι γενετικά, κάτι που είναι αναμενόμενο λόγω της μειωμένης γενετικής ροής μεταξύ τους. Η φυλή της Ορεινής Ηπείρου έχει και αυτή μεγάλες αποστάσεις από τις υπόλοιπες αλλά είναι πιο κοντά -γενετικά- με τις φυλές τις Άρτας (Φριζάρτα) και του Άργους. Με τη φυλή της Άρτας θα μπορούσε να υπάρχει γενετική ροή λόγω των κοντινών τόπων διαβίωσης, με τη φυλή του Άργους όμως η γενετική ομοιότητα δεν μπορεί να εξηγηθεί καθώς δεν είναι εύκολο να υπάρξει γενετική ροή ή σύγκλιση (διαφορετικά υψόμετρα στις περιοχές που διαβιούν) αλλά ούτε και κοινή γενεαλογία (η φυλή του Άργους είναι μια ντόπια φύλη ενώ η Ορεινή Ηπείρου προέρχεται από διασταύρωση ντόπιων φυλών με τη Γερμανική της Φριζλανδίας). Ωστόσο εδώ δεν αποκλείονται ανθρωπογενείς παραβάσεις που ευνόησαν τις επιμιξεις μεταξύ των φυλών. Κάποιες φυλές που είναι γνωστό ότι έχουν κοινή προέλευση, όπως της Θράκης με τη Σαρακατσάνικη (και οι δύο προέρχονται εν μέρη από την Τούρκικη φυλή Kivirik) και της Ζακύνθου και Κύμης (διασταυρώσεις με την Ιταλική φυλή Berkamusca) έχουν μικρές αποστάσεις, 0,016 και 0,017 αντίστοιχα. Αντιθέτως οι φυλές Κοζάνης, Κατσικά, Ορεινή Ηπείρου και Πηλίου που έχουν και αυτές κοινή καταγωγή (προέρχονται από διασταυρώσεις με την Ουγγρική φυλή Zackel), έχουν μεγαλύτερες αποστάσεις (από 0,029 έως και 0,033) που δείχνει ότι έχουν διαφοροποιηθεί αρκετά στα περιβάλλοντά που ζουν. Οι περισσότερες πάντως φυλές (Θράκης, Σαρακατσάνικη, Κοζάνης, Φλώρινας, Άρτας, Ζακύνθου, Πηλίου, Κύμης, Άργους και Καραμάνικη) έχουν περίπου τις ίδιες γενετικές αποστάσεις δηλώνοντας ότι γενικότερα υπάρχει γενετική ροή μεταξύ των φυλών έως ένα σημείο.

Το φυλογενετικό δέντρο δημιουργήθηκε με τη μέθοδο Neighbour-Joining (NJ) που βασίζεται στις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ατόμων και με τη χρήση του μοντέλου Maximum Composite Likelihood (MCL) που υπολογίζει ένα σετ παραμέτρων το οποίο εφαρμόζεται σε όλους τους υπολογισμούς αποστάσεων και έχει δείξει να μειώνει τα λάθη (ακόμη και σε μεγάλα δείγματα) ενώ δίνει μεγαλύτερους βαθμούς στο bootstrap (Tamura et al., 2013). Οι αντικαταστάσεις που υπολογίζονται είναι οι μεταπτώσεις και οι μεταστροφές οι οποίες θεωρείται ότι έχουν ένα κοινό ρυθμό, ενώ υπολογίζεται ότι υπάρχει ένα ομοιόμορφο πρότυπο υποκαταστάσεων ανάμεσα στα

διάφορα τμήματα. Το μοντέλο αυτό είναι το καλύτερο για τη μελέτη της υπερμετάβλητης D-loop, καθώς μπορεί να δώσει λιγότερο πολύπλοκα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν διαχωρισμό των ατόμων στις διαφορετικές φυλές. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς η περιοχή της D-loop δεν υπόκεινται σε εξελικτικές πιέσεις αφήνοντας περιθώριο για πολλές μεταλλάξεις (Arif *et al.*, 2009), αλλά και σε συνδυασμό με τα δεδομένα των διασταυρώσεων παγκοσμίως που δείχνουν τη γενετική ροή μεταξύ των διαφόρων φυλών.

Έχουν γίνει παρόμοιες έρευνες σχετικά με την προέλευση των οικόσιτων προβάτων, βασισμένες στην πιο συντηρημένη κεντρική επικράτεια αλλά και σε ολόκληρο το τμήμα της D-loop, σε φυλές από τη Νέα Ζηλανδία (Wood *et al.*, 1996), Ευρώπη, Ασία και Αφρική (Hindleder *et al.*, 1998) που συγκρίνουν τα αποτελέσματα αυτά με αντίστοιχα για τα εξημερωμένα βοοειδή (*Bos primigenius*). Οι μελέτες αυτές, καταλήγουν στο ότι υπάρχει μεγαλύτερη γενετική ετερογένεια στα πρόβατα από αυτή των εξημερωμένων βοοειδών, οι ενδοειδικές γενετικές αποστάσεις όμως μεταξύ των φυλών των βοοειδών είναι μεγαλύτερες από αυτές των προβάτων (Hindleder *et al.*, 1998) ίσως λόγω μεγαλύτερης απομόνωσης. Μελέτες στην D-loop σε κατσίκες (*Capra hircus*) και σύγκριση με ίδιες αλληλουχίες στα πρόβατα, έδειξε μεγαλύτερη ενδοειδική ποικιλότητα (MacHugh *et al.*, 2001) 1-2%, σε σχέση με το 0.5-1% των προβάτων (Urholt, *et al.*, 1977) ίσως λόγω της μεγάλης κινητικότητάς τους που οδηγεί στην εξάπλωση τους σε μεγαλύτερο εύρος περιβαλλόντων (Pereira *et al.*, 2009). Η περιοχή της D-loop έχει χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστεί η ενδοειδική ποικιλότητα και στα γουρούνια (*Sus scrofa*) που έδειξε ότι έχουν εξημερωθεί και αυτά από διάφορους άγριους πληθυσμούς, δίνοντας αρκετά μεγάλη ενδοειδική ποικιλότητα (Larson *et al.*, 2005). Στην Εικόνα 10 παρουσιάζονται τα φυλογενετικά δέντρα που έχουν γίνει με τη μέθοδο Σύνδεσης γειτόνων (NJ), βαζόμενη σε αλληλουχίες της D-loop για κάποια από τα εξημερωμένα είδη της Εύφορης Ημισελήνου (είδη που άρχισαν να εξημερώνονται πριν από ~ 10,000 χρόνια στη Μεσοποταμία) (MacHugh *et al.*, 2001). Παρόμοιες συγκρίσεις με αλληλουχίες για εξημερωμένα άγρια ζώα του ελληνικού χώρου θα μπορούσαν να γίνουν ώστε να συγκριθούν οι ενδο- και διά-ειδικές αποστάσεις μεταξύ αυτών και των προβάτων και κατ' επέκταση οι ρυθμοί προσαρμογής τους στα διαφορετικά περιβάλλοντα.



Εικόνα 10: Φυλογενετικά άρριζα δέντρα (μεθοδός NJ), βασισμένα σε αλληλουχίες τις D-loop για τα εξημερωμένα είδη: κατσικιών, προβάτων, γουρουνιών, βουβαλιών και αλόγων των οποίων η εξημέρωση ξεκίνησε από κοινή περιοχή και την ίδια χρονική περίοδο (MacHugh *et al.*, 2001)

Μελλοντικά θα πραγματοποιηθεί ανάλυση για τα 13 γονίδια του mtDNA που κωδικοποιούν υπομονάδες του OXPHOS: επτά πολυπεπτίδια του συμπλέγματος I (ND 1, 2, 3, 4L, 4, και 5), το οποίο έχει δείξει σημαντική προσαρμογή σε περιβάλλοντα βάσει προηγούμενων μελετών, ένα κυτόχρωμα (cyt b) του συμπλέγματος III, τρία πολυπεπτίδια του IV (COI, II και III) και δύο του συμπλέγματος V (ATP6 και 8) τα οποία έχουν επίσης παρασυστάσει προσαρμοστικές αλλαγές (Mishmar *et al.*, 2006). Ιδανικά, η δειγματοληψία θα μπορούσε να γίνει για

περισσότερα άτομα από κάθε φυλή καθώς και να καλύψει όλες τις ελληνικές φυλές. Σε ένα τελικό στάδιο θα μπορούσε να γίνει η σύγκριση των αλληλουχιών των mtDNA γονιδίων της OXPHOS με κρυσταλλογραφική ανάλυση των δομών των πρωτεϊνών στις οποίες αντιστοιχούν (Fonseca *et al.* 2007). Μια πιο ολοκληρωμένη ανάλυση θα περιλάμβανε και τα nDNA γονίδια για την ολοκληρωμένη εικόνα της περιβαλλοντικής επιρροής στην εξέλιξη της OXPHOS και των πρωτεϊνικών αλλαγών που τελικά οδηγούν στη ειδογένεση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbot R.J., Ritchie M.G. & Hollingsworth P.M. (2008) 'Introduction. Speciation in plants and animals: pattern and process', *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 363, 2965-2969.

Agarwal M., Shrivastava N. & Padh H. (2008) 'Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences', *Plant Cell Rep* 27:617-631.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Robetr K. & Walter P. (2002), fourth edition, Garland Science, New York.

Allendorf F.W., Luikart G. & Aitken S.N. (2008) 'Conservation and the Genetics of Populations', Wiley-Blackwell.

Altschul S.F. Madden T.L. Schaffen A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997), 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs', *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.

Arif I.A. & Khan H.A. (2009) 'Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review', *Animal Biodiversity and Conservation* 32.1.

Asahida T., Kobayashi T., Salton K. & Nakayama I. (1996) 'Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea', *Fisheries Sci* 62: 727-730.

Avise J.C., Shapira J.F., Daniel S.W., Aquadro C.F. & Lansman R. A. (1983) 'Mitochondrial DNA differentiation during the speciation process in *Peromyscus*', *Mol Biol Evol* 1(1): 38-56.

Barton N.H., Briggs D.E., Eisen J.A., Goldstain D.B. & Patel N.H.(2007) 'Evolution', Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bickford D., Lohman D.J., Sohdi N.S., Ng P.K.L, Meier R., Winker K., Ingram K.K. & Das I. (2006) 'Cryptic species as a window on diversity and conservation', *Trends in Ecology and Evolution*, vol.22 No3.

Blier P.U., Dufresne F. & Burton R.S. (2001) 'Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation', *Trends in Genetics*, Vol. 17, Issue 7: 400-406.

Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen, Wertheim-van Dillen P.M. & van der Noordaa J. (1990) 'Rapid and simple method for purification of nucleic acids', *J. Clin Microbiology Mar*; 28(3): 495-503.

Boore L.J. (1999) 'Animal mitochondrial genomes', *Nucleic Acids Research*, Vol. 27, No 8: 1767-1780.

Boyazoglou J., Hatziminaoglu J. & Zervas N.P. (1990) 'Prolific dairy sheep breeds in Greece', *Options Mediterraneennes* 12: 25-30.

Brown W.M, Matthew G Jr. & Wilson A.C. (1979) 'Rapid evolution of animal mitochondrial DNA' *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 76, No. 4: 1967-1971.

Brown D.T., Samuels D.C., Michael E.M., Turnbull D.M. & Chinnery P.F. (2001) 'Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes', *Am J Hum Genet* 68(2): 533-536.

Chauchan T. & Kumar R. (2010) 'Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture', *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1: 281-291.

Crarcraft J. (1983) 'Species concepts and speciation analysis', (editor: Johnston R.F.), *Current Ornithology*, New York: Plenum Press, 159-187.

Dowling D. K., Friberg U, Hailer F. & Arngvist G. (2007) 'Inergenomic Epistasis for Fitness: Within-Population Interactions Between Cytoplasmic and Nuclear Genes in *Drosophila melanogaster*', *Genetics* 175(1): 235-244.

Farias I.P., Orti G., Sampaio I., Schneider H. & Meyer A. (2001) 'The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes', *J Mol Evol* 53: 89-103.

Fonseca R., Johnson W., O'Brien S., Ramos M. & Antunes A. (2008) 'The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome', *BMC Genomics* 9:119.

Fox C.W. & Wolf J.B. (editors) (2006) 'Evolutionary Genetics: concepts and case studies', Oxford University Press, Inc, N.Y.

Futuyama D.J. (1995) 'Εξελικτική Βιολογία' (Ζούρος Λ., γενική επιμέλεια), δεύτερη έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο. (Δημοσίευση προτύπου: 1986)

Gagnaire P., Normandeau E. & Bernatchez L. (2010) 'Comparative genomics reveals adaptive protein evolution and a possible cytonuclear incompatibility between European and American Eals', *MBE Advance Access* (online),

Gallori E. & Branciamone S. (2012)'Origin and Evolution of Self-Replication Polymers on Mineral Habitats', *Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 22: 55-66.

Gershoni M., Templeton A.R., Mlshmar D. (2009) 'Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation' *BioEssays* 31: 642-650.

Groeneveld L. F., Lenstra J. A., Eding H., Toro M. A., Scherf B., Pilling D., Negrini R., E. K. Finlay, Jianlin H., Groeneveld E., Weigend S., & The GLOBALDIV Consortium (2010) 'Genetic diversity in farm animals – a review', *Animal Genetics* 41: 6-31.

- Hartl D.L. & Clarck A.G. (1997) 'Principles of Population Genetics', fourth edition, Sinauer Associates, Inc,Massachusetts.
- Heim I., Nickel M. & Brummer F. (2007) 'Molecular markers for species discrimination in poriferans: a case study on species of the genus *Aplysina*', *Prorofera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*, 361-371.
- Hickman J.C., Roberts L., Keen S., Larson A., l' Anson H. & Eisenhour D. (2007)'Integrated Priciples of Zoology', 14th edition, McGraw-Hill, Dubuque IA.
- Hiendleder S., Heidrun L., Wassmuth R. & Janke A. (1998) 'The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype', *J Mol Evol* 47:441-448.
- Hoelzel A.R. (1998) 'Molecular Genetic Analysis of Populations: A practical approach', Second edition, Oxford University Press.
- Holderegger R., Kamm U. & Gugerli F. (2006) 'Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics', *Landscape Ecology* 6: 797-807.
- Hudson G., Keers S., Man P., Griffiths P., Huoponen K., Savontaus M., Nikoskelainen E., Zeviani M., Carrara F., Horvath R., Karcagi V., Spruijt L., Coe I., Smeets H. & Chinnery P. (2005) 'Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder' *Am J Hum Genet* 77(6): 1086-1091.
- Hurst G. D. D. & Jiggins F. M. (2005) 'Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts', *Proceedings of the Royal Society* 272: 1525-1534.
- Jensen P. (2009) 'The ethology of domestic animals', second edition, CAB International, Oxfordshire, UK.
- Kalvatchev Z. & Draganov P. (2005) 'Single –strand conformation polymorphism (SSCP) analysis: A rapid and sensitive method for detection of genetic diversity among virus population', *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 9-14
- Keer J.T. & Birch L. (2008) 'Essentials of Nucleic Acids Analysis: A robust approach', LGS Limited, UK.
- King M. (1993) 'Species Evolution. The Role of Chromosomal Change', Cambridge University Press, Cambridge.
- Klutsch C.F.C., Seppala E.H., Uhlen M., Lohi H. & Savolainen P. (2011) 'Segregation of point mutation heteroplasmy in the control region of dog mtDNA studied systematically in deep generation pedigrees', *Int J Legal Med* 125: 527-535.
- Kocher T.D. & Stepien C.A. (1997) 'Molecular Systematics of Fishes' Academic Press, San Diego, USA.

Kukita Y., Tahira T., Sommer S.S. & Hayashi K. (1997) 'SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel', Hum Mutat. 10(5):400-7.

Lane N. (2009) 'Biodiversity: On the origin of bar codes', Nature 462: 272-274.

Larson G., Dobney K., Albarella U., Fang M., Matisoo-Smith E., Robins J., Lowden S., Finlayson H. Brand T., Willerslev E., Rowley-Conwy P., Andersson L. & Cooper A. (2005) 'Wordwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication', Science, 307:1618-1621.

Lemey P., Salemi M. & Vandamme A. (2009) 'The phylogenetic Handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing', second edition, Cambridge University Press.

Ligda Ch., Altarayrah J., Georgoudis A., & the ECONOGENE Consortium (2009) 'Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities', Small Ruminant Research 83: 42-48.

MacHugh D.E. & Bradley D.G. (2001), 'Livestock genetic origins: Goats buck the trend' PNAS vol. 98, no. 10: 5382-5384.

Marmur J. (1961) 'A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms', J. Mol. Bio. 3: 208-18.

Michaels G.S., Hauswirth W.W. & Laipis P.J. (1982) 'Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells', Developmental biology 94: 246-251.

Meadows J.R.S., Cemal I., Karaca O., Gootwine E. & Kijas J.W. (2007) 'Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East', Genetics 175: 13711-1379.

McBride M.H., Neuspiel M. & Wasiak S. (2006) 'Mitochondria: More Than Just a Powerhouse', Current Biology 16: R551-R560.

Mishmar D., Ruiz-Pesini E., Mondragon-Palomino M, Procaccio V., Gaut B. & Wallace D. (2006) 'Adaptive selection of mitochondrial complex I subunits during primate radiation', GENE section on evolutionary genomics 378:11-18.

Miya M. & Nishida M. (2000) 'Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion', Mol Phylogenet Evol, 17(3): 437-55.

Mullis K. & Fallona F. (1987) 'Specific synthesis of DNA *in vitro* via Polymerase Chain Reaction', Methods Enzymology, 155: 335-350.

Nei M. Kumar S. & Takahashi K. (1998) 'The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used', Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 12390-12397.

Nielsen R. (2005) 'Molecular signatures of natural selection', Annual Review of Genetics, 39: 197-218.

Non A.L., Kitchen A. & Mulligan C.J. (2007) 'Identification of the most informative regions of the mitochondrial genome for phylogenetic and coalescent analyses', *Mol Phylogenet Evol* 44(3): 1164-71.

Pereira F., Queiros S., Gusmao L., Nijman I.J., Johannes E.C., Lenstra A., Consortium E., Davis S.J.M., Nejmeddine & Amorin A. (2009) 'Tracing the history of goat pastoralism: New clues from mitochondrial and Y chromosome DNA in North Africa', *Mol Biol Evol* 26(12): 2765-2773.

Porcelli D., Barsanti P., Pesole G & Caggese C. (2007) 'The nuclear OXPHOS genes in insecta: a common evolutionary origin, a common cis-regulatory motif, a common destiny for gene duplicates', *BMC Evolutionary Biology* 7: 215.

Ray J. (1686) 'Historia plantarum species etc.' 3 vols. Vol. I. Londini: Clarck.

Russell P.J. (2009) 'iGenetics': Μία μεντελική προσέγγιση', έκδοση πρώτη, Pearson Education, Inc. Benjamin Cummings.

Shambrook J (2001) 'Molecular Cloning: Laboratory Manual', third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press: N.Y.

Staub J.E., Lopez-Sese A.I. & Fanourakis N. (2004) 'Diversity among melon landraces (*Cucumis melo* L.) from Greece and their genetic relationships with other melon germplasm of diverse origins', *Euphytica* 136: 151-166.

Strauss S.H., Bousquet J., Hipkins V.D., Hong Y.P. (1992) 'Biochemical and molecular genetic markers in biosystematic studies of forest trees', *New Forests*, 6: 125-158.

Sun C. Kong Q., Palanichamy M., Agrawal S., Bandelt H., Yao Y., Khan F. Zhu C., Chaudhuri T.K. & Zhang Y. (2006) 'The dazzling array of basal branches in the mtDNA macrohaplogroup M from India as inferred from complete genomes', *Mol Biol Evol.* 23(3): 680-90.

Swofford D.L., Olsen G. J. 1990. 'Phylogeny reconstruction In Molecular Systematics'. Hillis DM, Moritz C. (eds.). pp. 411-501. Sinauer, Sunderland, M.A.

Tamura K., Dudley J. Nei M. & Kumar S. (2007) 'MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0', *Molecular biology and Evolution*, vol. 24, issue 8:1596-1599.

Upholt W.B. & Dawid I.B. (1977) 'Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region', *Cell* 11(3): 571-83.

Wan Q., Wu H., Fujihara T. & Fang S. (2004) 'Which genetic marker for which conservation genetics issue?', *Electrophoresis* 25:2165-2176.

Wasko A.P., Martins C, Olivier C. & Foresti F. (2003) 'Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales', *Hereditas* 138: 161-165.

Watson J. D., Witkowski J. A., Myers R. M. & Caudy A. A. (2007) 'Ανασυνδισμένο DNA', *Ακαδημαϊκές Εκδόσεις*.

Xing F., Matsumiya T., Onomoto K., Hayakari R., Imaizumi T., Yoshida H., Yoneyama M., Fujita T. & Satoh K. () 'Foreign RNA induces the degradation of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS): The role of intracellular antiviral factors', *PLoS ONE* 7(9): e45136.

Αλαχιώτης Σ.Ν. (2007) 'Εισαγωγή στην εξέλιξη', Εκδοτικός οργανισμός Λιβάνη, Αθήνα.